

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean LAVOLLAY

Docteur de l'Université de Paris (Sciences)
Maître de Recherches

1^{re} THÈSE. — L'Oxydation des Diphénols, en particulier de l'Adrénaline.
(Préface à la recherche de l'identité de la Vitamine P).

2^e THÈSE. — Etat actuel du problème de la structure de la vitamine P
et de son rôle fonctionnel.

Soutenues le décembre 1942, devant la Commission d'examen

MM. JAVILLIER, *Président.*

AUBEL
MONNIER } *Examineurs.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

—
1942

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Nom du Candidat : **LAVOLLAY.**

Prénom : **Jean.**

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre : 2882

LAVOLLAY (Jean). — L'oxydation des diphénols, en particulier de l'adrénaline. (Préface à la recherche de l'identité de la vitamine P). — *Paris, Jouve et Cie*, 1942, in-8°, 126 p.

Th. Sc. Paris, 1942, N° 2882.

LAVOLLAY (Jean). — L'oxydation des diphénols, en particulier de l'adrénaline. (Préface à la recherche de l'identité de la vitamine P). — *Paris, Jouve et Cie*, 1942, in-8°, 126 p.

Th. Sc. Paris, 1942, N° 2882.

LAVOLLAY (Jean). — L'oxydation des diphénols, en particulier de l'adrénaline. (Préface à la recherche de l'identité de la vitamine P). — *Paris, Jouve et Cie*, 1942, in-8°, 126 p.

Th. Sc. Paris, 1942, N° 2882.

LAVOLLAY (Jean). — L'oxydation des diphénols, en particulier de l'adrénaline. (Préface à la recherche de l'identité de la vitamine P). — *Paris, Jouve et Cie*, 1942, in 8°, 126 p.

Th. Sc. Paris, 1942, N° 2882.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jean LAVOLLAY

Docteur de l'Université de Paris (Sciences)
Maître de Recherches

- 1^{re} THÈSE.** — L'Oxydation des Diphénols, en particulier de l'Adrénaline.
(Préface à la recherche de l'identité de la Vitamine P).
- 2^e THÈSE.** — Etat actuel du problème de la structure de la vitamine P
et de son rôle fonctionnel.
-

Soutenues le décembre 1942, devant la Commission d'examen

MM. JAVILLIER, *Président.*

AUBEL
MONNIER } *Examineurs.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1942

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyens honoraires . . M. MOLLIARD.

M. CH. MAURAIN.

Doyen. M. P. MONTEL, *Professeur, Théorie des fonctions.*

Professeurs honoraires

LÉON BRILLOUIN.
AUGER.
DANGEARD.
LESPIEAU.
VESSIOT.
PORTIER.
LAPICQUE.

G. BERTRAND.
Ch. FABRY.
LÉON BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSCQ.
BOHN.
RABAUD.

CAULLERY.
CARTAN.
E. BOREL.
A. COTTON.
J. DRACH.
M. GUICHARD.
LABROUSTE.

PROFESSEURS



Charles PÉREZ . . T Zoologie.
L. BLARINGHEM . T Botanique.
G. JULIA T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
C. MAUGUIN . . . T Mineralogie.
A. DENJOY T Géométrie supérieure.
L. LUTAUD T Géographie physique et Géologie dynamique.
G. BRUHAT T Physique.
E. DARMOIS . . . T Enseignement de Physique.
A. DEBIERNE . . . T Physique générale et Radioactivité.
L. DUNOYER T Chimie physique.
M. JAVILLIER . . . T Chimie biologique.
Henri VILLAT . . . T Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB T Géologie.
P. PASCAL T Chimie générale.
M. FRÉCHET T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
E. ESCLANGON . . T Astronomie.
H. BÉGHIN T Mécanique physique et expérimentale.
FOCH T Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER . . . Recherches Physiques.
De BROGLIE T Théories physiques.
CHRÉTIEN Optique appliquée.
PRENANT T Anatomie et Histologie comparées.
VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
COMBES T Physiologie végétale.
GARNIER T Application de l'analyse à la géométrie.
PÉRÉS T Mécanique rationnelle.
HACKSPILL T Chimie minérale.
TOUSSAINT Technique Aéronautique.
M. CURIE Physique (P. C. B.).

G. RIBAUD T Hautes températures.
CHAZY T Mécanique rationnelle
GAULT Chimie (P. C. B.).
CROZE T Physique théorique et Physique céleste.
DUPONT T Théories chimiques.
VALIRON T Calcul différentiel et intégral.
BARRABÉ Géologie structurale et géologie appliquée.
MILLOT Biologie animale (P. C. B.).
F. PERRIN Théories physiques.
VAVON T Analyse et mesures chimiques.
G. DARMOIS . . . T Mathématiques générales.
CHATTON T Biologie maritime.
AUBEL Chimie biologique.
J. BOURCART . . . Géographie physique et Géologie dynamique.
M^{me} JOLIOT-CURIE . Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL T Botanique.
CABANNES T Recherches physiques.
GRASSÉ T Zoologie (Evolution des êtres organisés).
PRÉVOST Chimie organique.
BOULIGAND Mathématiques.
CHAUDRON Chimie (P. C. B.).
WYART Minéralogie.
TEISSIER Zoologie.
MANGENOT Biologie végét. (P. C. B.).
P. AUGER Physique.
MONNIER Physiologie générale.
PIVETEAU Géologie.
ROCARD Physique.
H. CARTAN Calcul différentiel.
SCHAEFFER T Physiologie générale.
LAFFITTE Chimie (P. C. B.).

Secrétaire. A. PACAUD.

Secrétaire honoraire. . . D. TOMBECK

A MA FEMME

A MES PARENTS

A MON CHER MAÎTRE, LE PROFESSEUR M. JAVILLIER

Membre de l'Institut



INTRODUCTION

J'AI été conduit à l'étude de l'action des dérivés de la flavone sur l'autoxydation de l'adrénaline à la suite des circonstances suivantes.

En 1940, mon Maître le Professeur JAVILLIER, m'a prié de préparer des extraits d'écorces d'agrumes en vue d'obtenir des produits ayant l'activité vitaminique P, et d'étudier les propriétés de ces extraits.

A l'occasion de ces travaux, nous avons été amenés à envisager sous un jour nouveau la notion de vitamine P.

A l'origine de ce problème se trouvent les observations de SZENT-GYÖRGYI montrant que *l'orange et le citron, utilisés comme sources de vitamine C augmentent la résistance des vaisseaux capillaires et guérissent certains purpuras de l'Homme. L'acide ascorbique pur ne possède d'ailleurs pas cette propriété* (1).

On sait que le scorbut s'accompagne de phénomènes hémorragiques ; SZENT-GYÖRGYI attribua ces phénomènes au défaut de la substance hypothétique mise en évidence par ses expériences cliniques : il désigna cette substance sous le nom de vitamine P (de perméabilité capillaire).

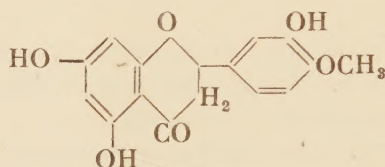
L'expérience faite sur des cobayes soumis au régime scorbutique montra à SZENT-GYÖRGYI que l'addition au régime d'un extrait de citron exempt d'acide ascorbique, diminue le nombre et l'importance des lésions hémorragiques et assure, de plus, une survie plus longue. Cette expérience fut considérée par l'auteur comme parfaitement démonstrative de l'existence, dans l'extrait de citron, d'une vitamine spéciale, différente de l'acide

(1) RUSZNYAK et SZENT-GYÖRGYI, *Nature*, 138, 127, 1936.

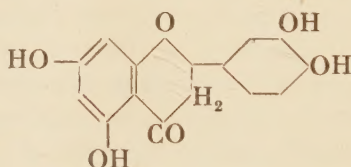
ascorbique, et capable de faire disparaître une partie des symptômes du scorbut expérimental. Le scorbut lui-même fut dès lors envisagé comme une carence mixte : défaut de vitamine C (acide ascorbique) associé au défaut de vitamine P.

Cette expérience ne put malheureusement être reproduite, ni par ZILVA, ni par SZENT-GYÖRGYI lui-même. Les faits acquis par l'expérimentation clinique sur l'Homme demeuraient cependant ; ils étaient confirmés et même étendus par d'autres auteurs.

L'activité physiologique des extraits d'oranges et de citrons fut d'abord attribuée par SZENT-GYÖRGYI à l'héspéridine (héspéridoside), hétéroside de l'héspérol : 5, 7, 3' trihydroxy, 4' méthoxyflavanone.



puis, lorsqu'il fut établi que cette substance est dénuée d'activité, à un corps voisin, l'ériodictyol-glucoside, hétéroside de l'ériodictyol : 5, 7, 3', 4', tétrahydroxyflavanone :



A la même époque (1938), HUSZAK (1), élève de SZENT-GYÖRGYI, fit la découverte suivante : certains diphenols permettent l'oxydation de l'acide ascorbique par l'eau oxygénée en présence de peroxydase (2).

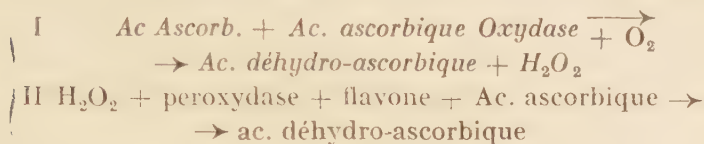
Pour ce rôle d'activateur, les polyphénols naturels ont des aptitudes diverses ; le pyrocatéchol est actif, l'héspéridine ne l'est pas ; par contre, l'ériodictyol est un fort activateur, ainsi que d'autres dérivés de la flavanone ou de la flavone.

L'oxydation biologique de l'acide ascorbique est réalisée chez les végétaux par une oxydase propre ; cette oxydation libère de

(1) HUSZAK, *Hoppe Seyler's Z.*, 247, 1937, 239.

(2) J'ai montré avec NEUMANN que l'adrénaline peut prendre dans ce système la place du substrat oxydable : LAVOLLAY et NEUMANN, *C. R.*, 213, 193-195, 1941.

l'eau oxygénée. Or, la peroxydase ne peut utiliser l'eau oxygénée pour oxyder une deuxième molécule d'acide ascorbique avec une vitesse suffisante, qu'en présence des polyphénols naturels et, en particulier, en présence des dérivés de la flavone. SZENT-GYÖRGYI estime donc que les dérivés de la flavone prennent place dans le système respiratoire des plantes à peroxydases :

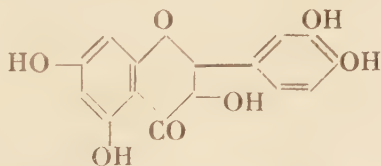


Il semble que ce savant attribue aux mêmes substances une fonction analogue dans l'organisme animal. En effet il écrit depuis, que « la flavone », pour manifester son action vitaminique chez l'animal, réclame la présence d'une petite quantité d'acide ascorbique, à défaut de laquelle elle reste sans effet. On trouve cette affirmation du moins dans une petite note publiée dans *Nature* (1) qui annonçait la publication de preuves expérimentales.

Je n'ai pas trouvé dans la littérature le travail ainsi annoncé.

La nature vitaminique de « la flavone » nous sembla donc, en 1940, extrêmement douteuse. Les faits bien établis concernaient l'action des extraits d'agrumes sur la résistance capillaire et sur la perméabilité des vaisseaux chez l'Homme.

Or, les extraits de SZENT-GYÖRGYI renfermaient de l'hésperidine en assez grande proportion, un hétéroside de l'ériodictyol — substance flavanonique — et peut-être un flavonol, le quercétol ou 3, 5, 7, 3, 4, pentahydroxyflavone :



auquel SZENT-GYÖRGYI attribuait l'action propre de l'extrait sur la tension artérielle (effet dépresseur temporaire).

Notons que, d'après un récent travail de MAGER (2), l'hétéroside d'ériodictyol présent dans la « citrine », l'extrait préparé par

(1) BENTSATH et SZENT-GYÖRGYI, *Nature*, 140, 426, 1937.

(2) A. MAGER, *Z. physiol. Chem.*, 1942, 274, 109-15.

la technique SZENT-GYÖRGYI, serait un *l. rhamnoside d'ériodictyol*.

A l'origine des présentes recherches se trouve l'hypothèse de travail suivante. L'hormone qui règle le « tonus » des capillaires est l'adrénaline; si des substances exogènes sont capables de modifier la résistance de ces vaisseaux et leur perméabilité, il est permis de supposer qu'elles exercent cet effet en modifiant, en exaltant, l'action de l'adrénaline. Cette hormone étant une substance éminemment oxydable à l'air, qui est effectivement oxydée dans l'organisme avec une très grande vitesse — *avec ou sans l'intervention d'enzymes* —, l'action d'une substance exogène active sur la résistance ou la perméabilité capillaire pourrait être due à une inhibition de l'oxydation de l'adrénaline.

J'ai préparé, en 1940, des extraits d'écorces d'oranges et de citrons par une méthode permettant d'obtenir la fraction flavanonique et flavonique, d'où l'*hespéridine* était séparée et rejetée. Ces extraits sont effectivement actifs sur la résistance capillaire de l'Homme (1) et du Cobaye (2). *Conformément à l'hypothèse ci-dessus, ces extraits présentaient une forte action inhibitrice de l'autoxydation de l'adrénaline (3). Ils avaient une action inverse sur l'autoxydation de l'acide ascorbique qui est fortement activée en leur présence.*

Le phénomène d'inactivation de l'oxydation de l'adrénaline m'a semblé mériter en lui-même une étude approfondie.

Ce problème est évidemment lié au problème général de l'oxydation de l'adrénaline, oxydation qui est elle-même, au moins à ses débuts, un cas particulier de l'oxydation des diphénols. Catalyse et inhibition de l'autoxydation des diphénols et de l'adrénaline, tels sont les problèmes dont j'ai voulu mettre au point les données positives et systématiser les théories explicatives.

Le présent travail résume les résultats de cette étude purement chimique. Ces résultats sont par conséquent dissociés de l'étude plus générale que j'ai entreprise sur l'activité vitaminique P.

Ma profonde reconnaissance va à mon Maître le Professeur

(1) CHIRAY, LAVOLLAY, MASCHAS, *La Revue du Foie*, t. I, n° 1, 53-56, 1942

(2) SEVIN, Expériences inédites.

(3) LAVOLLAY et NEUMANN, *C. R.*, 1941, 212, 251.

M. JAVILLIER, dont j'ai l'honneur d'être le collaborateur depuis plus de douze années ; au Centre National de la Recherche Scientifique qui m'a permis de vivre en restant fidèle à la recherche expérimentale ; au Conservatoire National des Arts et Métiers où la plupart de mes travaux ont été effectués. Ma reconnaissance va aussi aux collaborateurs qui m'ont beaucoup aidé ; J. NEUMANN dont la collaboration me fut précieuse pour tous les travaux d'ordre physiologique ; J. SEVESTRE qui, avec un grand dévouement, a préparé avec moi les corps dont j'avais besoin.

OXYDATION EN SOLUTIONS TAMPONNÉES EXEMPTES DE CATALYSEURS

L'adrénaline ($C_9 H_{13} O_3 N$) est le méthylaminoéthanol dihydroxybenzène 1-2, elle a été isolée par TAKAMINE à partir des glandes surrénales du Bœuf en 1901. Cette substance cristalline, incolore lorsqu'elle est parfaitement pure, fond vers 211-216°. (P. F. instantané au bloc : vers 263° d'après G. BERTRAND).

Elle est très peu soluble dans les solvants usuels (eau, alcool, éther). Elle doit à son groupement aminé la faculté d'être soluble dans les acides avec lesquels elle donne des sels solubles.

Possédant un atome de carbone asymétrique, la molécule d'adrénaline est douée du pouvoir rotatoire. L'adrénaline naturelle des surrénales est lévogyre : la synthèse chimique conduit au mélange racémique d'où l'on sépare les variétés lévogyre et dextrogyre. Comme dérivé du pyrocatechol, l'adrénaline lévogyre est un réducteur puissant. Mais ce sont les propriétés physiologiques de cette substance qui lui confèrent un intérêt primordial. Introduite en quantité infime dans le torrent circulatoire elle exerce un effet vasoconstricteur sur les artères et les artérioles, un effet tonique sur le cœur ; elle élève transitoirement la tension artérielle. En agissant sur les tissus, l'adrénaline reproduit les effets d'une excitation des nerfs sympathiques.

L'adrénaline lévogyre est vingt fois plus active que l'adrénaline dextrogyre.

Les solutions aqueuses d'adrénaline, en milieu neutre ou alcalin se colorent à l'air, plus ou moins rapidement, en rose puis en rouge. La lumière active cette transformation et surtout les radiations verte et rouge [E. KEESER (1)]. Il s'agit d'une oxydation.

(1) E. KEESER, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 166, 624, 1932.

Dans cette oxydation, comme dans les oxydations de l'adrénaline par différents agents chimiques, la molécule est oxydée comme dérivé du pyrocatechol ; ces agents portent d'abord leur action sur les deux fonctions phénol du noyau, la chaîne latérale n'étant pas attaquée avec la même facilité. C'est pourquoi il convient d'examiner d'abord l'oxydation du pyrocatechol ; le mécanisme de cette réaction devant être valable pour les premiers stades au moins de l'oxydation de l'adrénaline, réalisée par voie chimique (L'oxydation biochimique est naturellement réservée).

Oxydation du pyrocatechol.

Les solutions aqueuses de pyrocatechol s'oxydent à l'air, en donnant naissance à des produits colorés en brun ou en vert. WILLSTÄTTER et PFANNENSTIEL (1), WILLSTÄTTER et FRITZ MÜLLER (2) ont réussi à montrer que le premier produit résultant de l'oxydation est l'orthoquinone ou l'orthodicétone, produit très instable en présence de traces d'eau.

WILLSTÄTTER et PFANNENSTIEL (1904) ont donné une méthode de préparation de l'orthoquinone, qui consiste à traiter par l'oxyde d'argent une solution de pyrocatechol dans l'éther sec. Ils décrivent cette orthoquinone comme un produit rouge. Précédemment JACKSON et KOCH (3) n'avaient pas réussi à isoler l'orthoquinone. WILLSTÄTTER et MÜLLER (4) ont fait des remarques du plus grand intérêt. Si on traite le pyrocatechol, en solution éthérée ou en solution benzénique, par l'oxyde d'argent, convenablement préparé, en présence de sulfate de sodium desséché, en 15 secondes l'oxydation est terminée. Les solutions sont alors vertes, elles déposent par refroidissement ou par addition d'éther de pétrole, des cristaux *incolors* et, dans certains cas, des cristaux rouges. Les cristaux incolores sont difficiles à saisir ; ils sont très instables. Ils se transforment spontanément pour donner le corps rouge. Cette transformation se réalise parfois lorsque l'on touche les cristaux.

Les auteurs ont conclu à l'existence de deux isomères de l'orthoquinone, dont les propriétés optiques sont tellement

(1) WILLSTÄTTER et PFANNENSTIEL, *Ber.*, 37, 4744, 1904.

(2) WILLSTÄTTER et MÜLLER, *Ber.*, 41, 2580, 1908.

(3) JACKSON et KOCH, *Ber.*, 31, 1457, 1898.

(4) WILLSTÄTTER et MÜLLER, *loc. cit.*

dissemblables que leur constitution doit être différente. Leurs solubilités dans l'éther sont d'ailleurs différentes.

L'orthoquinone de structure peroxydique, disaient-ils, apparaît comme un dérivé du benzène qui, en ce qui concerne les possibilités de liaison de sa molécule, ne se distingue pas essentiellement du pyrocatechol. Ils supposèrent que ce corps ressemble optiquement au pyrocatechol, donc que c'est la variété incolore.

La quinone cétoïde, au contraire, n'est pas un dérivé du benzène ; en ce qui concerne les doubles liaisons elle est très différente de la substance mère aromatique ; elle présente un système de doubles liaisons vraies de sorte qu'elle est toujours colorée.

Le schéma suivant résume les conclusions théoriques des auteurs :



L'oxydation du pyrocatechol, par l'oxyde d'argent, aboutissant, en milieu anhydre à l'orthoquinone, serait donc réalisée en deux étapes ; la première conduisant à une forme peroxydique incolore dont le noyau est encore celui du benzène et, la seconde, par une réaction d'équilibre, à la forme cétoïde colorée dont les doubles liaisons du noyau sont remaniées.

La grande activité chimique de la forme peroxydique incolore serait en rapport avec l'instabilité de structure de sa molécule. Cette variété est un oxydant énergique qui libère l'iode de l'iode de potassium, fait virer au bleu la teinture de gaïac, est réduite à l'état de pyrocatechol par l'acide nitreux (1).

BALL et CHEN (2) ont étudié le potentiel d'oxydoréduction de mélanges de pyrocatechol avec son premier produit d'oxydation en solution aqueuse. Ces déterminations ont été rendues

(1) SZENT-GYÖRGYI (*Biochem. Z.*, 1925, 162, 399) a suggéré que l'orthoquinone pouvait être le premier produit d'oxydation enzymatique du pyrocatechol. Voir PUGH et RAPER (1927) ; WAGREICH et NELSON (1936) et HAROLD JACKSON (1939).

(2) BALL et CHEN, *J. Biol. chem.*, 102, 691-719, 1933.

possibles par l'utilisation d'un appareil spécial permettant de mélanger en proportions convenables le pyrocatéchol et un oxydant comme le sulfate de cérium, et de déterminer le potentiel à des intervalles de temps très rapprochés et très précoces. Ces auteurs ont trouvé que le *potentiel des mélanges évolue très rapidement*. Cela s'explique par la disparition du produit d'oxydation, dont la décomposition est si rapide qu'il en disparaît 50 % en six minutes (Demi-vie de l'orthoquinone = 6 minutes, à pH 4,388 et 30° C).

L'instabilité du premier produit d'oxydation du pyrocatéchol, déjà mise en évidence par WILLSTÄTTER et ses collaborateurs, fait l'objet de mesures précises de la part de BALL et CHEN, qui soulignent pour une série de substances, que les *orthoquinones sont en général plus instables que les para*. La substitution d'une chaîne latérale ionisable accroît encore l'instabilité de l'orthoquinone (Fait important qui trouve son application immédiate à l'adrénaline).

L'instabilité de l'orthoquinone est en outre très sensible à l'élévation du pH, au point d'être un obstacle insurmontable à la détermination du potentiel pour des pH légèrement supérieurs à la neutralité.

De même, l'élévation de la température augmente la vitesse de destruction de l'orthoquinone, qui double lorsque la température du milieu passe de 30° à 37°4 (1).

Retenons de ces travaux qu'il est pratiquement impossible de chiffrer le potentiel d'oxydoréduction du mélange pyrocatéchol-quinone en raison de l'instabilité de l'équilibre auquel donne lieu ce système.

Autoxydation du pyrocatéchol.

On doit rattacher aux travaux sur l'oxydation du pyrocatéchol par les agents chimiques ceux qui concernent l'oxydation de cette substance par l'oxygène moléculaire, ou autoxydation.

Le pyrocatéchol cristallisé s'oxyde lentement à l'air : les cristaux incolores, conservés dans un flacon en présence d'air, brunissent à la longue et, d'autant plus, qu'ils sont exposés à la

(1) Dans les mêmes conditions, l'adrénaline ne peut pas être étudiée à pH > 7,66 ; la vitesse de disparition de sa quinone est multipliée par 3 lorsque la température passe de 30° à 37°4.

lumière. Nous bornerons cependant notre examen à l'autoxydation des solutions aqueuses de ce diphenol.

On sait que des traces d'alcalis favorisent l'oxydation des solutions de l'hydroquinone et du pyrocatechol.

GUNNAR BLIX (1) a mesuré l'absorption de l'oxygène par les solutions de diphenols (pyrocatechol, résorcinol, hydroquinone, adrénaline) et déterminé la vitesse initiale de la réaction. L'auteur a noté que, pour le pyrocatechol, il est nécessaire que l'alcalinité soit nettement plus forte que dans le cas de l'hydroquinone pour que la mesure de la consommation d'oxygène soit possible. Il en est de même pour l'adrénaline.

A pH-12, la quantité d'oxygène utilisée dans les quatre premières heures correspond à 3 à 4 atomes par molécule. On en conclut que l'oxydation va, dans ces conditions, beaucoup plus loin que la formation de la quinone correspondante (1 atome par molécule); résultat qui concorde avec ceux des expériences antérieures en milieu alcalin (W. VAUBEL) (2).

L'auteur estime qu'il est naturel de relier l'oxydation de ces substances, en solution alcaline, avec le fait que ce sont des acides faibles dont l'anion n'est présent, en quantité appréciable, qu'en solution alcaline.

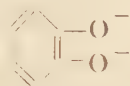
Il recherche si la vitesse d'oxydation dépend de la concentration en ions monovalents de la substance ou en ions divalents. Dans le premier cas, le produit de la vitesse d'oxydation et de la concentration en ions H doit être constant (si la concentration en anions est petite par rapport à celle des molécules non dissociées). Dans le second, le produit de la vitesse et du carré de la concentration en ions H doit être constant. Pour satisfaire à la condition de concentration faible en anions par rapport à celle des molécules non dissociées, la vitesse d'oxydation à déterminer est la vitesse initiale.

BLIX opère par micromanométrie; le milieu est tamponné au borate N/10 dans le cas du pyrocatechol et aux phosphates M/15 dans le cas de l'hydroquinone. La vitesse d'oxydation initiale est déterminée graphiquement à partir des points correspondants aux instants postérieurs à 2 m. 1/2. Avec le pyrocatechol, l'auteur trouve que le produit $\frac{\Delta O_2}{\Delta t} \cdot [H^+]^2$ est constant. En admettant que la manière d'opérer donne une mesure exacte de la

(1) GUNNAR BLIX, *Skand. Arch. für Physiologie*, 1929, 55-56, 131-172.

(2) W. VAUBEL, *Z. Angew. Chem.*, 1903, 16, 389.

vitesse de la réaction primaire, les résultats indiquent que la vitesse d'oxydation du pyrocatéchol dépend de la concentration de l'anion bivalent



L'autoxydation du pyrocatéchol en milieu aqueux est donc directement liée à la dissociation des deux hydroxyles phénoliques ; elle est, par conséquent, d'autant plus active que le pH est élevé (inversement proportionnelle au carré de la concentration en ions H^+ si le coefficient d'activité est égal à l'unité — cas des solutions suffisamment diluées).

Autoxydation de l'hydroquinone.

Cet important résultat appelle les remarques suivantes :

LA MER et RIDEAL (1) étudiant l'autoxydation du p. diphénol ont montré que l'autoxydation est, à pH correspondants, plus importante dans les solutions tamponnées aux borates alcalins que dans les solutions de phosphates. Il est donc clair, comme le fait remarquer SAINT-MAXEN (2), que le pH ne suffit pas à déterminer la vitesse de l'autoxydation. Les conclusions de cet auteur concernant les propriétés des solutions d'hydroquinone contenant des sels alcalins sont les suivantes :

1° « Pour une catégorie de solutions tampon donnée, la vitesse initiale d'oxydation varie seulement avec la valeur de l'exposant d'hydrogène et ne dépend pas de la concentration des sels alcalins présents.

2° Les vitesses d'oxydation ne sont pas liées uniquement à la valeur de l'exposant d'hydrogène, mais dépendent aussi de la nature de la solution utilisée.

C'est ainsi qu'à pH 8, la vitesse d'oxydation est environ 13 fois plus grande, avec une solution de Sørensen au borate de sodium qu'avec une solution de phosphates de sodium. »

Pour éclaircir cette question, nous sommes contraints d'examiner encore l'oxydation de l'hydroquinone, le pyrocatéchol n'ayant pas fait l'objet des mêmes études. On s'efforcera d'étendre ensuite les faits au pyrocatéchol.

(1) LA MER et RIDEAL, *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, 46, 223.

(2) SAINT-MAXEN, Thèse Doct. ès-Sc., Paris, 1934.

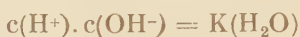
D'après v. EULER et BRUNIUS (1) (1928), la vitesse d'oxydation des solutions d'hydroquinone étant proportionnelle au carré de la concentration des ions OH, l'ion bivalent ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$)⁻ est la forme mobile autoxydable de ce corps. En effet la réaction d'ionisation



est régie par

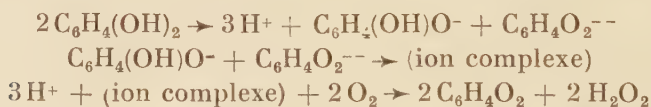
$c(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2) \cdot c^2(\text{H}^+) = K_1$, la concentration de l'hydroquinone non ionisée étant infiniment grande par rapport à celle des ions formés.

Or, entre les concentrations de H^+ et de $(\text{OH})^-$, la relation suivante est vérifiée :



et par conséquent la concentration en ions hydroquinoniques $c(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)$ est proportionnelle au carré de la concentration en ions $(\text{OH})^-$.

D'après LA MER et RIDEAL (2) la vitesse initiale d'oxydation des solutions d'hydroquinone en milieu tamponné par les phosphates est proportionnelle non pas au carré de la concentration en ions $(\text{OH})^-$, mais à la puissance $3/2$ de cette concentration. Pour rendre compte de ce fait ils imaginent un mécanisme donnant 3 ions H^+ pour deux molécules d'hydroquinone, soit un ion complexe entre l'ion monovalent et l'ion bivalent de l'hydroquinone.



Nous avons déjà vu plus haut que GUNNAR BLIX (3) étudiant à cet égard le cas du pyrocatechol, trouve que la vitesse initiale d'oxydation de celui-ci est proportionnelle au carré de la concentration en ions $(\text{OH})^-$. Mais BLIX fait ses mesures relatives au pyrocatechol en tampon de borates, tandis que les résultats concernant l'hydroquinone sont obtenus en tampon de phosphates. BLIX a d'ailleurs retrouvé la proportionnalité de la vitesse d'oxydation de l'hydroquinone en tampon phosphaté, à la puissance $3/2$ de la concentration en ions $(\text{OH})^-$, en accord

(1) v. EULER et BRUNIUS, *Z. Physik. chem.*, Abt. A, 1928, 139, 615.

(2) LA MER et RIDEAL, *loc. cit.*

(3) GUNNAR BLIX, *loc. cit.*

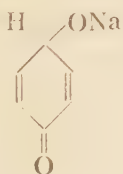
avec LA MER et RIDEAL et en contradiction avec EULER et BRUNNIUS.

Examinant l'hypothèse de LA MER et RIDEAL, suivant laquelle l'oxydation de l'hydroquinone dépend de la formation d'un ion complexe entre ions monovalent et bivalent de ce corps, SAINT-MAXEN (1) s'exprime ainsi : « Sans méconnaître la valeur de telles explications, il convient de remarquer qu'elles nécessitent une hypothèse particulière à chaque milieu tampon, et que d'autre part, ne faisant intervenir que les ions de l'hydroquinone, elles n'envisagent pas une influence possible de la nature du milieu tampon ». Or, les résultats expérimentaux autorisent à supposer une telle influence, ainsi qu'il a été dit ci-dessus.

De l'étude de l'oxydation des solutions aqueuses d'hydroquinone additionnées de bases alcalines ou alcalino-terreuses, SAINT-MAXEN conclut que « les vitesses d'oxydation sont identiques pour des quantités équivalentes de bases. Elles sont indépendantes de la concentration du diphénol et de la nature de la base. Elles ne dépendent que du rapport moléculaire entre la base et le diphénol ».

On sait que l'hydroquinone se conduit comme un diacide et que les constantes d'ionisation ont respectivement pour valeurs : $1,1 \cdot 10^{-10}$ et environ $2 \cdot 10^{-12}$.

En soumettant à l'analyse spectrale les solutions d'hydroquinone et de phosphates ou de borate de sodium, SAINT-MAXEN reconnaît la présence dans ces solutions de l'hydroquinonate acide de sodium, forme active autoxydable des solutions alcalines de ce diphénol. L'auteur avait, au préalable, attribué à ce dérivé monosodique la formule



qui possède la structure quinonique et confère aux solutions alcalines d'hydroquinone, en absence de toute oxydation, une teinte jaune caractéristique et d'ailleurs réversible (par addition d'acide). Or, si l'on tient compte des constantes d'ionisation,

(1) SAINT-MAXEN, *loc. cit.*

$$\left. \begin{array}{l} 1 \times 10^{-2} \\ 8,8 \times 10^{-8} \\ 3,6 \times 10^{-13} \end{array} \right\} \text{ de l'acide phosphorique}$$

$$\left. \begin{array}{l} 1,1 \times 10^{-10} \\ 2 \times 10^{-12} \end{array} \right\} \text{ de l'hydroquinone}$$

les solutions tampons étant des mélanges de phosphates mono-acide et de phosphate biacide de sodium, il est possible de raisonner de la façon suivante.

Dans ces solutions, une à deux molécules de soude sont en présence d'une molécule d'acide phosphorique. Or, en présence de deux acides de constantes d'ionisation différentes, une base se répartit proportionnellement aux racines carrées des constantes d'ionisation et proportionnellement aux concentrations des acides en présence. « La première acidité phosphorique peut être considérée comme entièrement saturée par la première molécule de soude, en raison de sa très forte constante d'ionisation. Par contre, la seconde molécule aura tendance à se partager entre la seconde acidité phosphorique et la première acidité de l'hydroquinone. En première approximation nous pouvons en effet négliger les acidités finales de l'hydroquinone ($2 \cdot 10^{-12}$) et de l'acide phosphorique ($3,6 \cdot 10^{-13}$) ».

Or, la racine carrée des constantes d'ionisation

$$\sqrt{\frac{8,8 \cdot 10^{-10}}{1,1 \cdot 10^{-10}}} = 28,5 ;$$

dans les expériences où le rapport moléculaire de l'acide phosphorique à l'hydroquinone était égal à 3, on calcule que la seconde molécule de soude se partage entre ces deux substances dans le rapport de $3 \times 28,5$ à 1 soit 85 à 1.

Dans une solution tampon de pH 8,04 (0,5 cc. de solution de phosphate monosodique et 9,5 cc. de phosphate disodique), il y a 1,95 molécules de soude par molécule d'acide phosphorique dont une molécule est saturée par la première acidité phosphorique ; le reste soit 0,95 molécule se partage avec l'hydroquinone qui en saturer $\frac{0,95}{85} = 0,01$ molécule environ.

Cette solution s'oxyde avec une vitesse de 0,71 centième de cc. par minute et par gr. d'hydroquinone.

Or, SAINT-MAXEN montre qu'une solution aqueuse de 1 gr. d'hydroquinone additionnée de 0,01 molécule de soude s'oxyde

avec une vitesse de 0,70 centième de cc. par minute. La concordance est excellente, et il en est de même pour les autres tampons phosphatés.

Dans le cas des solutions tampons au borate de sodium, un calcul analogue montre que le $\frac{1}{3}$ de la soude présente doit se combiner à l'hydroquinone et, par conséquent, si l'oxydation est liée à la formation du sel sodique, le calcul prévoit que la vitesse de cette oxydation doit être de beaucoup supérieure à ce qu'elle est en tampon phosphaté de même pH.

Dans ce cas, comme dans le précédent, il y a parfaite concordance entre l'oxydation mesurée et celle qu'on obtient en solution aqueuse en présence de la quantité de soude que le calcul montre devoir saturer la première acidité de l'hydroquinone.

En somme, l'oxydabilité des solutions d'hydroquinone en solutions alcalines ou en solution dans les tampons serait « intimement liée à la formation de l'hydroquinonate acide de sodium ».

EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

J'ai voulu rechercher comment varie l'autoxydation de l'hydroquinone, sans catalyseur, et, au même pH, en solutions tamponnées aux phosphates d'une part, et de l'autre en solutions tamponnées au borax-ClH (SÖRENSEN).

Les expériences ont été faites par micromanométrie au moyen de l'appareil de WARBURG, sur le schéma suivant : solution tampon (pH 7,62) : 2 cc. + solution aqueuse d'hydroquinone : 1 cc. = 2 mgr. d'hydroquinone (1). Les déterminations sont faites en double (volume total 3 cc.). Comme les chiffres qui nous intéressent concernent la vitesse initiale de la réaction, les expériences sont arrêtées dès la 55^e minute (température 27°,1) temps correspondant à l'absorption d'environ $\frac{1}{2}$ atome-gramme d'oxygène par molécule-gramme d'hydroquinone. Les résultats sont les suivants :

(1) Solution exempte de tout catalyseur métallique.

Temps en minutes	Volume d'oxygène absorbé (mm ³)	
	Tampon aux phosphates	Tampon borate ClH
11	23,3	31,5
27	51,6	69,2
51	93,1	117,6
55	98,5	126,3

On voit que, pour des valeurs identiques de l'exposant d'hydrogène, l'oxydation de l'hydroquinone est sensiblement plus

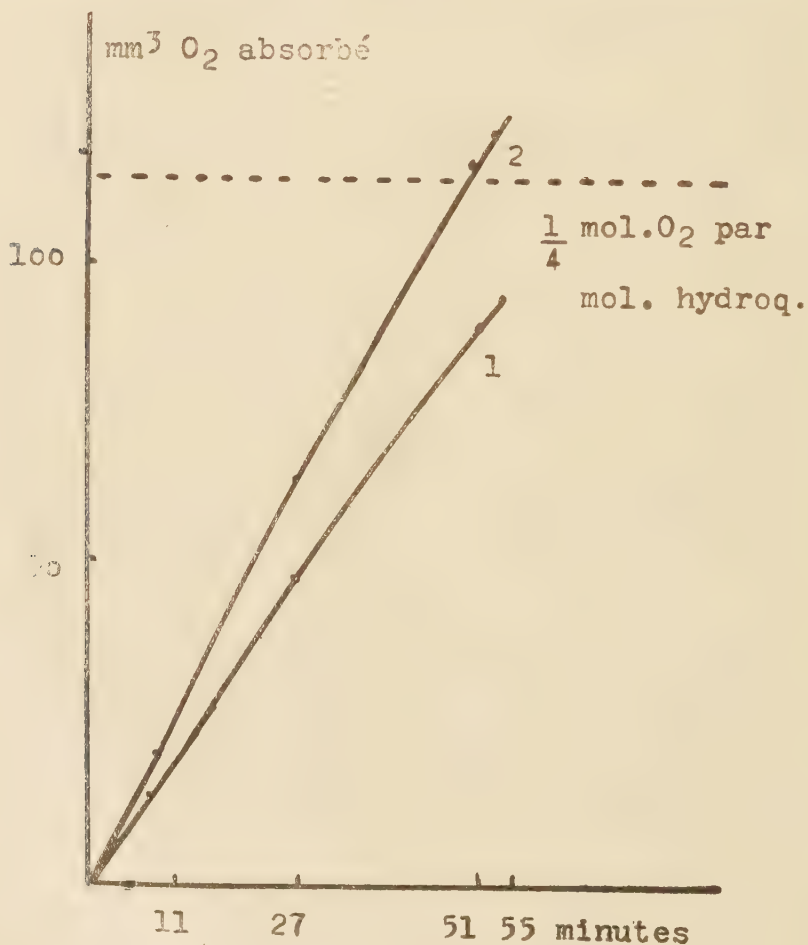


Fig. 1. — 1. Hydroquinone, tampon phosphaté pH 7,62 ;
2. Hydroquinone, tampon boraté pH 7,62.

rapide dans la solution tamponnée au borate, puisque la moyenne des lectures place l'absorption d'oxygène à 31 % au-dessus de la moyenne des lectures correspondantes de la solution tamponnée aux phosphates.

***Examen optique des solutions d'hydroquinone oxydées,
au même pH, en présence de tampons aux phosphates
et au borate ClH.***

A la fin de l'expérience précédente, on a prélevé 2 cc. de chacune des solutions, on les a dilués à 10 cc. avec de l'eau distillée et déterminé l'absorption lumineuse de ces liquides, sous une épaisseur de 1 cc. Les mesures ont été faites à l'aide de l'électrophotomètre Meunier ; en lumière verte. Les résultats sont les suivants :

Nature du tampon	Divisions du tambour, proportionnelles à la densité optique (Moyennes) Ecran vert
Phosphates	16,6
Borate-ClH	14,7

Le rapport des densités optiques en lumière verte $\left(\frac{14,7}{16,6}\right)$ montre que le produit d'oxydation de l'hydroquinone dans le tampon boraté absorbe moins les radiations vertes que le produit formé dans le tampon aux phosphates du même pH. Or l'oxygène consommé en milieu boraté est de 30 % supérieur. On en conclut nécessairement que les produits d'oxydation à l'air de l'hydroquinone sont différents suivant que la solution est tamponnée aux phosphates ou au borate-ClH, ou que l'anion du sel tampon exerce une action sur le spectre d'absorption de ce produit.

Des solutions d'hydroquinone dans les tampons précédents (pH 7,62) s'étant oxydées spontanément à l'air, pendant une dizaine de jours, à la température ordinaire, ont une densité optique pour les radiations bleues, proportionnelles aux nombres 163 (phosphates) et 132 (borate).

Si l'on ne considérait que les propriétés optiques des solutions on serait donc amené à la conclusion fausse que l'oxydation est plus rapide dans le tampon phosphaté.

On trouvera ici un nouvel exemple de l'influence de la nature des sels alcalins utilisés comme tampons (1) et en même temps de l'insuffisance de la notation pH pour définir les propriétés des solutions.

En outre on ne saurait trop mettre en garde contre une généralisation abusive des méthodes optiques sans vérification préalable de la légitimité d'application de ces méthodes aux solutions étudiées.

Extension des résultats au pyrocatéchol.

Il semble que ces résultats puissent être étendus au cas du pyrocatéchol, ce qui signifie que la vitesse d'oxydation du pyrocatéchol doit être liée à l'élévation du pH dans la mesure où le milieu — c'est-à-dire les anions en présence — permettent la formation du sel monobasique de ce diphenol.

La constante de dissociation de la première fonction acide du pyrocatéchol étant inférieure à celle de l'hydroquinone on peut prévoir que la vitesse d'oxydation du pyrocatéchol est très inférieure à celle de l'hydroquinone (coefficient de dissociation : $1,1 \times 10^{-10}$) en milieu de même pH.

De fait, G. BLIX a trouvé, par exemple, une vitesse d'autoxydation qui, dans certaines conditions de concentration, s'exprime par 2,78 mm³ d'oxygène par minute pour l'hydroquinone en solution de pH 7,6 tamponnée aux phosphates. La vitesse d'autoxydation du pyrocatéchol n'atteint la même valeur que pour les pH situés vers 9,7 en solution tamponnée aux borates.

En réalité, l'autoxydabilité des deux diphenols est encore plus différente que ne l'indiquent ces chiffres, puisque l'acide borique est un acide beaucoup plus faible que l'acide phosphorique.

EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

J'ai recherché, au moyen de l'étude électro-photométrique, comment varie la vitesse d'autoxydation des solutions de pyrocatéchol dans le même tampon à des pH différents.

On verse dans des fioles d'Erlenmeyer en Pyrex : 10 cc. de tampon aux phosphates et 10 cc. d'une solution de pyrocaté-

(1) Cf. SAINT-MAXEN, *loc. cit.* Th. Doct. ès Sc., Paris, 1934.

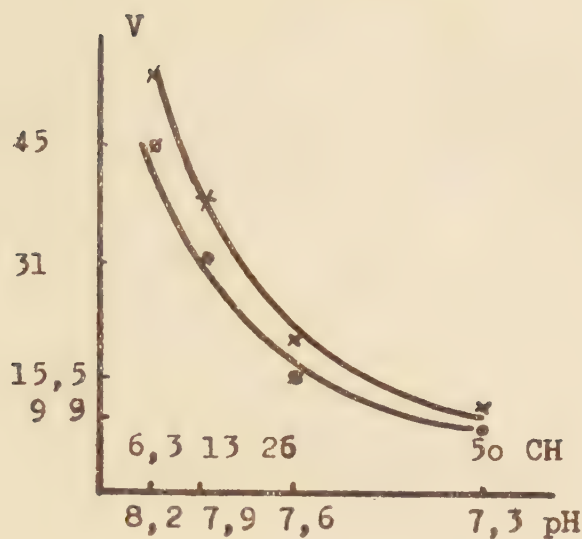


FIG. 2. — Vitesse d'oxydation en fonction de la concentration en ions H^+ . (Tampon de phosphates).

••• 22 heures, température ordinaire.
x x x 25 h. 30 m., —

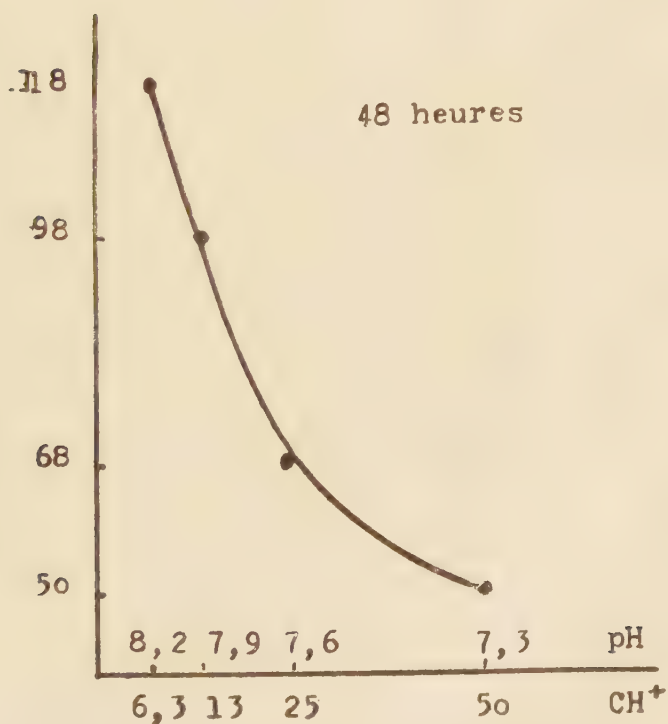


FIG. 3. — Vitesse d'oxydation en fonction de la concentration en ions H^+ (Tampon de phosphates).

••• 48 heures.

chol à 50 mgr. pour 100 cc., soit 5 mgr. La solution contient en outre, 4 mgr. de Cu^{++} pour accélérer l'oxydation. Les Erlenmeyer sont maintenus à la température ordinaire et agités de temps en temps de façon rigoureusement égale. Les densités

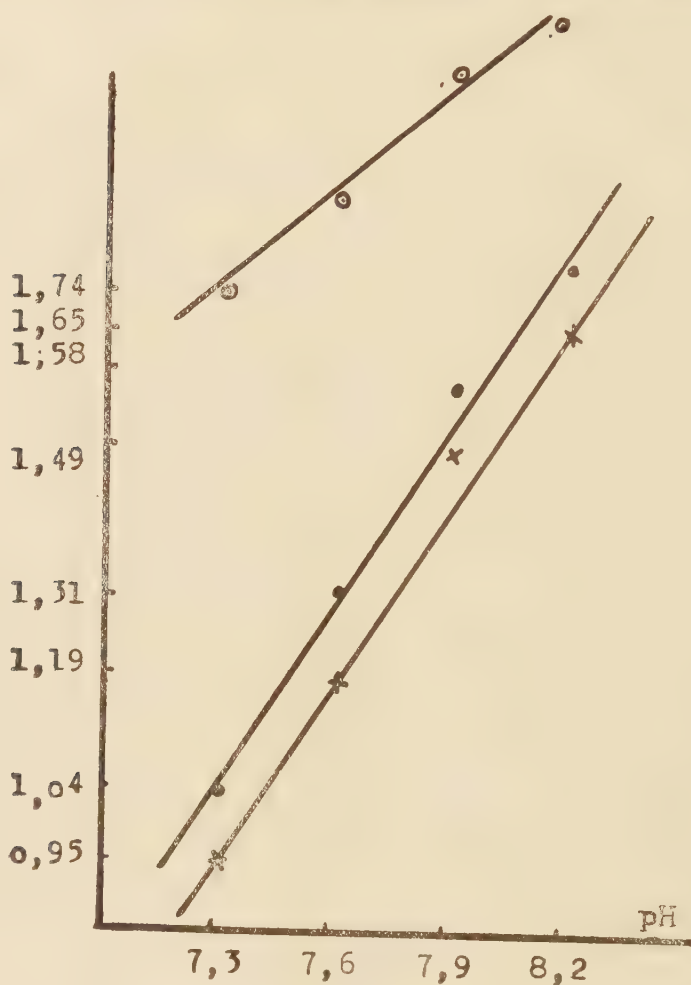


Fig. 4. — Log. de la vitesse d'oxydation en fonction du pH.
 x x x Mesures faites après 22 heures (température ordinaire)
 • • • — 25 h. 30 m. —
 o o o — 48 heures —

optiques des solutions sont mesurées de temps en temps en lumière verte. Les densités optiques augmentent avec le temps et avec l'oxydation du diphénol. On peut admettre, au moins au

début de l'oxydation, que la densité optique est proportionnelle à la masse de pyrocatechol oxydé.

J'ai pris, comme termes de comparaison, les densités optiques présentées par les solutions au bout de 22 heures. Si l'on porte en abscisses, les concentrations en ions H^+ des solutions tamponnées, et en ordonnées les densités optiques (ou les chiffres proportionnels lus sur le tambour de l'appareil), on obtient la courbe de la figure 1.

En portant en abscisses les valeurs du pH, et en ordonnées les logarithmes des densités optiques (proportionnelles aux vitesses d'oxydation, les points s'alignent bien sur une droite.

Le logarithme de la vitesse initiale d'oxydation croît linéairement avec l'exposant d'hydrogène.

pH	Vitesse d'oxydation	C ^{oa} en ions H^+	Valeur de K, calculée d'après :	
			$V = K \frac{1}{(CH^+)}$	$V = K \frac{1}{(CH^+)^2}$
7.3	11	50	550	27.500
7.6	20,5	25	512	12.812
7.9	38.5	13	500	6.506
8.2	55	6,3	346,5	2.183
— 1 —				

Dans le tableau on a fait figurer les vitesses initiales d'autoxydation et les concentrations en ions H^+ des solutions tampons correspondantes. Dans les deux dernières colonnes on a inscrit les valeurs du coefficient de proportionnalité K, calculées : 1^o en admettant que V est proportionnel à l'inverse de la concentration en H^+ : ($V = K \frac{1}{(H^+)}$) et 2^o en supposant que V est proportionnel à l'inverse du carré de la concentration en H^+ : ($V = K \frac{1}{(H^+)^2}$).

Les résultats montrent clairement que V ne varie pas suivant l'inverse du carré de la concentration en ions H^+ . Les valeurs de K calculées en admettant $V = K \frac{1}{H^+}$ varient beaucoup moins et l'on peut légitimement conclure que la vitesse d'oxydation est inversement proportionnelle à la concentration en ions H^+ , ou directement proportionnelle à la concentration en ions OH^- .

Si notre méthode nous permet la mesure de la vitesse initiale d'oxydation — comme il nous le paraît —, c'est donc l'ion monovalent  qui est en jeu dans l'autoxydation du pyrocatechol en solution aqueuse tamponnée aux phosphates.

Cette conclusion ne concorde pas avec celle de G. BLIX qui a trouvé, en mesurant l'absorption de l'oxygène par les solutions de pyrocatechol, une proportionnalité de la vitesse d'oxydation au carré de la concentration en ions OH.

Mes expériences montrent que les solutions de pyrocatechol s'oxydent avec une vitesse initiale proportionnelle à la concentration en ions (OH) de la solution (inversement proportionnelle à la concentration en (H)) et que, par conséquent, cette vitesse dépend, comme la vitesse d'oxydation des solutions d'hydroquinone (1), de la concentration des ions pyrocatechol monovalents présents dans la solution.

Oxydation du pyrocatechol dans le tampon boraté.

J'ai soumis à la mesure de la densité optique — en lumière verte — une solution de pyrocatechol s'autoxydant à l'air dans le tampon au borax -ClH. L'expérience a été conduite de la même manière que la précédente. Les pH étudiés s'échelonnent entre les valeurs 7, 6 et 8,8. L'autoxydation s'est poursuivie à la température ordinaire. La coloration des solutions est beaucoup plus lente à s'établir que dans le tampon aux phosphates ; phénomène déjà observé avec l'hydroquinone (2). Les mesures ont donc été faites après quatre jours d'autoxydation. Bien que ce temps d'oxydation soit trop prolongé pour qu'on puisse considérer les densités optiques comme proportionnelles aux vitesses *initiales* d'oxydation, on notera pourtant que les logarithmes de ces densités et par conséquent, les log. des concentrations en pyrocatechol oxydé sont proportionnels au pH.

(1) Résultats de SAINT-MAXEN.

(2) Ce qui ne signifie pas, comme nous l'avons vu, que l'oxydation soit plus lente.

pH	Densité optique de la solution après quatre jours
7,62	12,5
8,14	21
8,51	25
8,80	39

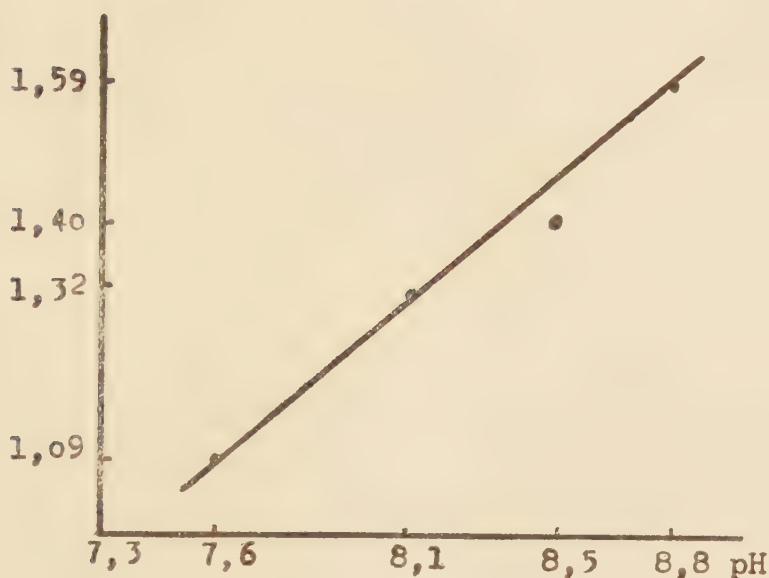


FIG. 5. — Pyrocatéchol en solution tamponnée au borate-ClH.
Log. de la densité optique en fonction du pH.

Pour cette étude, il a été nécessaire — comme il a été dit plus haut — d'accélérer le phénomène d'autoxydation par des traces de cuivre.

En effet, aux valeurs étudiées de la concentration en ions hydrogène, la vitesse de l'autoxydation du pyrocatéchol est extrêmement restreinte. Il est possible que l'adjonction du cuivre ait quelque peu modifié l'allure des phénomènes.

On trouvera plus loin une étude comparée de l'oxydation du pyrocatéchol en solutions tamponnées et comportant ou non le sel catalyseur cuivrique.

Quoi qu'il en soit il paraît intéressant de noter que l'oxydation du pyrocatéchol, catalysée par la présence du Cu, suit, en milieu tamponné par les sels alcalins, les mêmes lois que

l'oxydation de l'hydroquinone dans les solutions également tamponnées et exemptes de catalyseur métallique.

Oxydation des solutions tamponnées d'adrénaline (sans catalyseur).

En ce qui concerne l'adrénaline elle-même, GUNNAR BLIX a montré, en 1929, que cette substance, en solution dans un tampon au borate, s'autoxyde avec une vitesse qui est directement liée à la valeur du pH. Cette vitesse est d'ailleurs, dans toute la gamme des pH étudiés, très supérieure à la vitesse d'autoxydation du pyrocatechol. Ainsi à pH 9,2, cette vitesse est mesurée par 0,5 mm³ d'oxygène par minute dans le cas de l'adrénaline, alors qu'elle n'est que de 0,19 mm³ d'oxygène par minute pour le pyrocatechol (1).

De plus, G. BLIX a trouvé que le produit $\frac{\Delta O_2}{\Delta t} \cdot [H^+]$ est constant. En admettant que sa méthode de détermination de la vitesse d'oxydation, lui permette d'obtenir une bonne représentation de la vitesse initiale de la réaction primaire, ce qui paraît vraisemblable, la vitesse d'oxydation de l'adrénaline est donc proportionnelle à la concentration en ions (OH) et dépend de la concentration de l'anion d'adrénaline monovalent.

D'après cet auteur, par conséquent, si on doit s'attendre à la formation de l'orthoquinone au cours de l'autoxydation de l'adrénaline, les observations résumées ici, sont en faveur de la supposition que cette formation d'orthoquinone se fait en deux temps. L'auteur ne donne d'ailleurs aucune précision complémentaire.

Il semble donc bien que l'autoxydation de l'adrénaline en milieu alcalin, comme celle du pyrocatechol et comme celle de l'hydroquinone dépende de la présence du sel monoacide correspondant.

En ce qui concerne l'hydroquinone cette constatation ame-

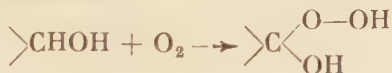
(1) Il ne faut sans doute pas attribuer une grande signification aux vitesses relatives d'oxydation de ces deux substances qui paraissent dépendre avant tout des conditions de milieu. Voir mes propres expériences où l'adrénaline s'oxyde avec une vitesse très inférieure à celle du pyrocatechol (de l'adrénaline synthétique U. C. L. A. F. ; tampon borate-ClH de pH 8,5). Il est possible également que les impuretés de l'adrénaline naturelle modifient sérieusement cette vitesse d'oxydation.

nait SAINT-MAXEN aux considérations suivantes : « Les spectrogrammes des solutions alcalines d'hydroquinone témoignent d'un changement de structure antérieur à toute action de l'oxygène. L'oxydation des solutions alcalines d'hydroquinone est donc incompatible avec les mécanismes... dans lesquels la modification structurale de la molécule benzénique est postérieure, ou corrélative d'un apport d'oxygène. Il en est de même de celui de WIELAND (1) qui peut convenir, par contre, dans certaines réactions de catalyse oxydante ». Déjà EULER et VAN BOLIN (2), constatant que l'addition de soude à une solution d'hydroquinone, à l'abri de l'air, détermine une coloration jaune, l'attribuaient à la forme quinonique.

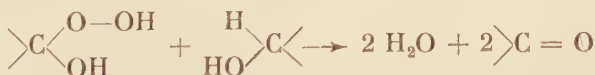


A ce propos, André JOB (3) s'exprime ainsi : « A notre avis, il est possible que la simple juxtaposition d'une molécule de soude ou de l'ion (OH) à une molécule d'hydroquinone détermine un phénomène d'halochromie » : « Certaines molécules organiques incolores deviennent colorées en fixant par coordination la molécule d'un composé métallique ».

SAINT-MAXEN adopte le schéma d'EULER et VAN BOLIN, dans lequel la modification de structure est antérieure à l'oxydation ; pour lui, le mécanisme de l'oxydation de l'hydroquinone « se réduit alors à celui du groupement fonctionnel CHOH (ou de l'ion monovalent correspondant) ». Il pense qu'il y a formation d'un peroxyde primaire.



Ce peroxyde jouant le rôle d'autoxydateur vis-à-vis de l'accepteur constitué par une seconde molécule, conduit à la quinone plus stable.



(1) WIELAND et FRANKE, *Liebig's Ann.*, 1928, 464, 101.

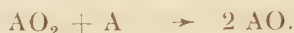
(2) EULER et VAN BOLIN, *Z. physik. chem.*, 1909, 66, 71.

(3) A. JOB, Rapport au II^e Conseil Solvay de Chimie. Bruxelles, 1925.

Tel serait le mécanisme de l'autoxydation de l'hydroquinone en milieu alcalin.

Un tel mécanisme s'écarte beaucoup des phénomènes d'oxydation déshydrogénante décrits par WIELAND.

Dans le schéma de SAINT-MAXEN, la forme quinolique de la molécule de diphenol est antérieure à toute oxydation. L'oxydation consiste alors en l'addition d'une molécule d'oxygène (oxygénation), formation d'un peroxyde AO_2 , qui, en présence d'une seconde molécule de quinol A, donne deux molécules de la quinone plus stable :



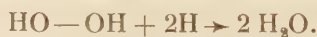
L'idée de l'autoxydation qui ne résulte pas d'une « activation » de l'oxygène mais, avant tout, d'une réaction de l'ensemble de la molécule par remaniement des doubles liaisons correspond à l'ancienne théorie de TRAUBE, développée par ENGLER, BACH. Depuis les travaux de MANCHOT (1900) on a en outre invoqué de plus en plus une « activation » de l'oxygène par formation de peroxyde.

On sait en quoi la théorie de WIELAND s'oppose à cette conception.

« Une autre classe de processus d'autoxydation, beaucoup plus importante par son étendue et sa signification, a de particulier que ce n'est pas de l'oxygène qui est accepté par le substrat mais bien de l'hydrogène qui en est enlevé.

A l'autoxydation additive on peut ainsi opposer l'autoxydation déshydrogénante. Au point de vue cinétique il existe entre elles une différence remarquable dans le fait que la plupart des autoxydations déshydrogénantes ont besoin d'être accélérées par l'intervention de catalyseurs ».

Pour WIELAND les catalyseurs « activent » l'hydrogène de la matière organique qui devient capable de s'additionner à la molécule d'oxygène, tout comme le Pd ou le Pt mis en présence d'hydrogène et d'oxygène moléculaire réalisent la réaction $\text{O} = \text{O} + 2\text{H} \rightarrow \text{HO} - \text{OH}$. La réaction fondamentale de l'autoxydation déshydrogénante est donc la formation d'eau oxygénée



Dans la théorie de l'« activation de l'oxygène par formation de peroxyde primaire », illustrée par MANCHOT et JOB, on considère l'eau oxygénée, souvent rencontrée au cours de l'autoxydation, comme provenant d'une réaction secondaire de l'eau sur le peroxyde primaire.

Dans la théorie de WIELAND, au contraire, l'eau oxygénée est le produit primaire de la rencontre de la molécule d'oxygène avec deux atomes d'hydrogène libérés du substrat autoxydable.

Cette théorie a été prononcée par WIELAND pour la première fois en 1912 ; elle était alors tout à fait révolutionnaire. On doit noter que l'expérience de base de WIELAND a été justement faite sur un diphénol : l'hydroquinone. L'hypothèse fondamentale de l'auteur était que les phénomènes d'hydrogénation catalytique réalisés par le Pd colloïdal sont vraisemblablement réversibles. Si par exemple la quinone, mise en présence d'une quantité équivalente d'H et de Pd ne se transforme pas entièrement en hydroquinone, l'hydroquinone doit être amenée au même état d'équilibre par le Pd, c'est-à-dire lui céder de l'H, ou s'oxyder en quinone. L'expérience confirma cette manière de voir. Cependant, cette expérience fut malheureusement erronée ; l'hydrogène soi-disant cédé au Pd n'était que de l'acétone provenant de la préparation du catalyseur, ainsi que WIELAND le reconnut lui-même. La vérification directe de la théorie de la déshydrogénation n'a donc pas réussi. Pourtant il serait abusif de trouver là un argument contre la théorie même. En effet, ce résultat négatif s'explique très bien depuis que l'on connaît mieux la thermodynamique de la réaction cherchée.

GILLESPIE et HALL (1) ont déterminé l'énergie libérée dans la réaction conduisant au palladiure d'hydrogène : (8,7 K. cal.). La chaleur de déshydrogénation de l'hydroquinone est de 42,8 C ; il est clair, par conséquent, que la formation d'une quantité mesurable de quinone, sous l'effet du Pd, est impossible.

L'échec de la démonstration provient donc d'une circonstance expérimentale qui ne saurait mettre en cause la théorie de la déshydrogénation : à savoir l'absence d'accepteur thermodynamiquement possible (2).

La production d'eau oxygénée au cours de l'oxydation déshydrogénante est un indice, et cette substance doit être recherchée « toutes les fois où des raisons particulières ne le rendront pas impossible ».

« Au point de vue cinétique, dit WIELAND, il existe entre elles (l'autoxydation additive et l'autoxydation déshydrogénante) une différence remarquable dans le fait que la plupart des autoxy-

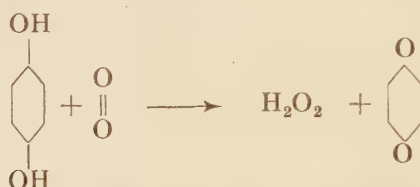
(1) GILLESPIE et HALL, *Am. Soc.*, 1926, 48, 1207.

(2) On sait que les exemples d'oxydation de substances organiques par déshydrogénation sont très abondants.

dations déshydrogénantes ont besoin d'être accélérées par l'intervention de catalyseurs ».

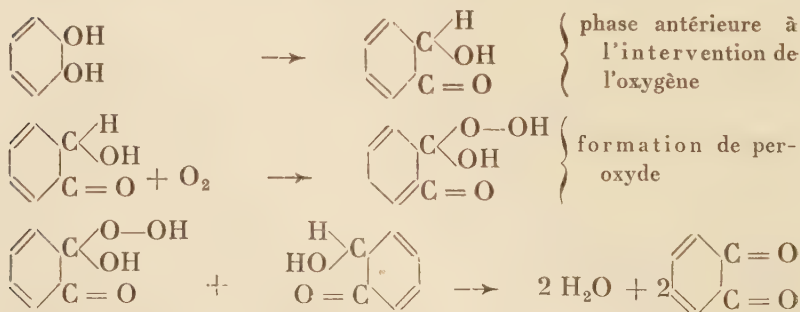
La validité de la conception de WIELAND a été recherchée, en particulier par WIELAND et FISCHER (1) dans le cas de l'oxydation du pyrocatechol et de l'hydroquinone. L'activation de l'hydrogène et son transport à l'oxygène moléculaire a été essayée par ces auteurs au moyen de l'enzyme d'un Basidiomycète : *Lactarius vellereus*. Des préparations ont été obtenues à partir de ce champignon, par précipitation fractionnée de l'enzyme, finalement exemptes de peroxydase et de catalase.

Or, l'action d'un tel système sur l'hydroquinone, en présence d'air, aboutissait à la formation de quinone et était accompagnée de la production d' H_2O_2 en quantité approchant la valeur théorique prévue dans la réaction :



Mais l'absence de catalyseur doit faire rejeter un tel mécanisme dans le cas de l'autoxydation des solutions tamponnées par des sels alcalins. Dans ce cas, l'autoxydation est liée à l'existence d'un ion monovalent du diphenol, ainsi qu'il a été démontré par SAINT-MAXEN sur l'exemple de l'hydroquinone et par nous-même sur l'exemple du pyrocatechol.

Une seule des deux fonctions (OH) étant intéressée dans la réaction primaire de l'autoxydation, on est conduit à admettre un mécanisme analogue à celui qui a été proposé pour la description des phénomènes intéressant l'hydroquinone.



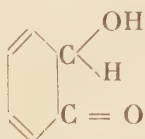
(1) WIELAND et FISCHER, *Ber.*, 1926, 59, 1180.

Tel paraît être le mécanisme probable de la première phase de l'autoxydation de l'adrénaline.

Il est cependant impossible d'affirmer que l'oxydation de cette substance est réalisable sans la présence d'un catalyseur. Les ions métalliques exercent une telle action catalytique prooxygène ; comme il est pratiquement impossible de priver totalement des substances comme l'hydroquinone, le pyrocatechol ou l'adrénaline de toute trace d'éléments minéraux, il serait à notre avis très imprudent de ne pas envisager l'intervention de ces catalyseurs dans l'autoxydation de ces substances à l'état réputé « pur ».

L'emploi de verrerie parfaitement propre et d'eau redistillée dans des appareils en Pyrex est, dans ces études une précaution indispensable, mais non suffisante. On sait, en effet, combien les procédés de purification, de recristallisation par exemple sont inefficaces lorsqu'il s'agit d'éliminer des traces d'éléments métalliques qui souvent se concentrent, au contraire, dans la substance cristallisée, lorsque ces éléments ont quelque affinité pour le substrat ce qui est justement le cas entre les métaux catalyseurs et les diphénoles, comme nous le verrons plus loin.

En résumé, il semble acquis, qu'en absence de catalyseurs, l'oxydation des diphénoles et en particulier de l'adrénaline, débute par une réaction d'addition d'une molécule d'oxygène à une molécule du diphénole. La susceptibilité de cette dernière molécule dépend directement de la concentration en ions OH de la solution et l'on est conduit à admettre que la molécule active présente la structure quinolique.



Ce mécanisme serait exclusivement valable dans le cas des milieux exempts de catalyseurs d'oxydation.

En présence de tels catalyseurs, nous serons conduits à admettre la possibilité d'autres mécanismes.

II

CATALYSE POSITIVE DE L'AUTOXYDATION

Dans cette étude de l'oxydation catalysée de l'adrénaline, nous nous référerons souvent, comme il a été fait dans le chapitre précédent, aux phénomènes plus simples de l'oxydation catalysée des o et p diphénols, en particulier, à ceux de l'oxydation du pyrocatéchol.

Nous examinerons successivement la catalyse de l'oxydation de l'adrénaline par certaines substances organiques, puis la catalyse par les ions métalliques sur laquelle nous nous étendrons plus longuement.

Comme ces phénomènes ont généralement beaucoup plus intéressé les physiologistes que les chimistes, nous aurons souvent à examiner les observations faites par des chercheurs de discipline plus physiologique que chimique.

Les catalyseurs positifs organiques.

Aldéhydes.

W. CRAMER (1), fait, en 1911, la remarque suivante : 5 cc. d'une solution d'adrénaline à 1/50.000, mis en présence de 5 cc. d'une solution de formaldéhyde à 1/500 et maintenus pendant 4 à 5 minutes à 37°, ont perdu leur activité physiologique. Le produit n'exerce plus aucune action sur la tension artérielle. L'auteur conclut de cette inactivation à la présence d'un groupe aminé dans la molécule d'adrénaline, groupe donnant naissance à un composé de condensation avec l'aldéhyde :



(1) W. CRAMER, *J. of. Physiol.*, 1911, 42, 36 P.

Pour CRAMER l'inactivation de l'adrénaline par l'aldéhyde formique était donc due à une réaction de condensation et non pas à un phénomène d'oxydation.

MALAFAYA BAPTISTA et TOSCANO RICO (1) sont également physiologistes. Les excellents travaux de ces auteurs concernent l'inactivation de l'adrénaline par les aldéhydes en milieu tamponné.

A des solutions d'adrénaline diluée (1/50.000) placées dans des tubes à essais et tamponnées à pH 7,4 par un mélange de phosphates de sodium on ajoute des quantités égales de différents aldéhydes : formol, méthylglyoxal, aldéhyde glycérique, aldéhyde acétique (M.25). On porte les tubes, pendant 1 h. 1/2 à 30° et l'on teste sur l'animal l'activité adrénalinique des mélanges, que l'on compare à celle d'une solution témoin, maintenue pendant le même temps, et à la même température, en présence du tampon seul.

Tandis que l'adrénaline du tube témoin ne subit qu'une destruction légère, celle qui est en contact avec un aldéhyde est plus ou moins fortement inactivée.

Pour cette inactivation, l'aldéhyde acétique CH_3CHO est le plus actif, ensuite le méthylglyoxal : $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CHO}$; enfin l'aldéhyde glycérique : $\text{CH}_2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CHO}$. La présence d'une substance aussi réductrice que l'acide ascorbique qui préserve l'adrénaline de son autoxydation proprement dite, est ici sans action sur le phénomène d'inactivation de l'adrénaline.

Quant à l'inactivation elle-même de l'adrénaline, elle est contrôlée, non seulement par l'épreuve portant sur la tension artérielle, mais par un ensemble d'essais impressionnant montrant que la substance a perdu son activité physiologique (Préparation de Loewen-Trendelenburg ; intestin isolé de Lapin ; œil énucléé de Grenouille ; muscle bronchique de Chien et de Chat).

BAYER et WENSE (2) (1938), ont apporté la démonstration, pour nous très importante, que l'inactivation de l'adrénaline par l'acétaldéhyde est due à l'oxydation de l'adrénaline catalysée par la présence de l'aldéhyde. Les auteurs ont noté que les solutions d'adrénaline additionnées d'acétaldéhyde sont beaucoup

(1) MALAFAYA BAPTISTA et TOSCANO RICO, *C. R. Soc. biol.*, 1935, 118, 1118 ; *ibid.*, 1935, 120, 545 ; MALAFAYA Baptista, *ibid.*, 1935, 120, 547.

(2) BAYER et WENSE, *Arch. exp. Pathol. Pharmac.*, 1938, 188, 114-20 ; *Arch. Int. Pharm. Thérap.*, 1938, 58, 103-107.

plus vite et plus intensément colorées en rouge que les solutions exemptes de cet aldéhyde. Cette coloration est due au premier produit d'oxydation, relativement stable, de l'adrénaline, l'adrénochrome (Voir chapitre précédent).

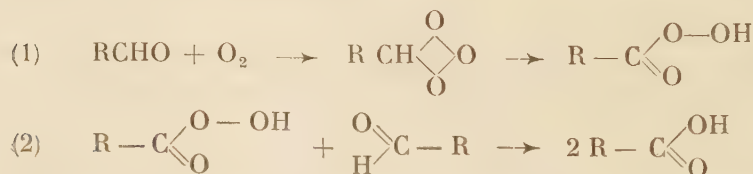
BAYER et WENSE ont également mis avec clarté en évidence le rôle de l'oxygène dans cette inactivation, ce qui nous permettra désormais de remplacer le terme « inactivation » par celui « d'oxydation ».

En effet, si l'on mélange extemporanément les solutions d'adrénaline et d'acétaldéhyde, on obtient une liqueur présentant l'activité normale d'une solution d'adrénaline. Si l'on fait barbotter de l'oxygène dans un semblable mélange porté à 40°, on obtient, au bout d'une heure, une inactivation totale de l'adrénaline. Par opposition, le même mélange d'adrénaline et d'acétaldéhyde, maintenu pendant 14 heures à 40°, mais en absence d'oxygène, conserve toute son activité.

On est donc bien en présence d'une catalyse de l'oxydation de l'adrénaline par l'oxygène atmosphérique. WIELAND et RICHTER (1) (1932), ont montré que si l'on agite une solution aqueuse d'aldéhyde benzoïque, acétique ou propionique — éventuellement en présence de traces de sels de fer, — le peracide correspondant prend naissance par oxydation, et l'on peut doser cet acide par iodométrie.

WIELAND a d'ailleurs montré, à maintes reprises, que, même en solution aqueuse, la réaction entre un aldéhyde et l'oxygène n'a pas son origine dans une déshydrogénation de l'aldéhyde, mais que c'est une véritable autoxydation passant par le peracide.

Le schéma de cette réaction a été donné par BAYER et VILLIGER (2) (1900) dans le cas de l'autoxydation de l'aldéhyde benzoïque parfaitement sec :



D'après WIELAND (3) l'autoxydation de l'acétaldéhyde s'ar-

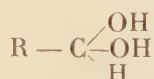
(1) WIELAND et RICHTER, *Liebig's Ann.*, 1931, 226, 486 ; 1932, 284, 495.

(2) BAYER et VILLIGER, *B.*, 1900, 33, 1581.

(3) WIELAND, *B.*, 1921, 54, 2353.

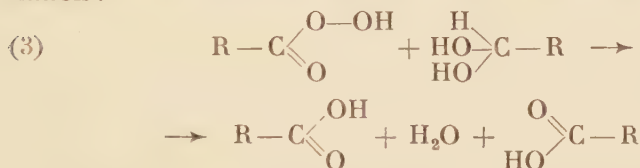
rête, en absence d'eau, au stade peracide, tandis qu'en milieu aqueux la réaction se poursuit jusqu'à la formation d'acide acétique.

L'eau exerce d'ailleurs une action inhibitrice sur ces phénomènes d'autoxydation ; WIELAND interprète cette action comme due à l'immobilisation d'un certain nombre de molécules d'aldéhyde sous forme d'hydrate :



qui ne subissent pas l'addition de O_2 .

Les molécules non hydratées donnent naissance au peracide qui réagit sur l'aldéhyde hydraté lequel subit une déhydrogénation :



Tel est le schéma, appuyé par de nombreuses preuves, qui représenterait (1) l'autoxydation de l'aldéhyde en milieu aqueux, tandis que le schéma de BAEYER et VILLIGER serait valable en milieu anhydre. Quoi qu'il en soit la réaction primaire est toujours une véritable autoxydation avec formation de peracide dont la concentration est notable en raison de la vitesse plus faible avec laquelle se poursuit la réaction (3).

C'est à la présence de ce peroxyde d'aldéhyde (acide peracétique) que BAYER et WENSE attribuent la catalyse de l'oxydation de l'adrénaline, dans les expériences ci-dessus décrites. WENSE (2) lui-même a montré, par un procédé très élégant, que les quantités de peroxyde présents dans les solutions d'acétaldéhyde augmentent avec le temps et avec l'exposition à la lumière. Avec une solution d'acétaldéhyde de trois semaines, une solution d'adrénaline $\frac{1}{200.000}$ additionnée d'acétaldéhyde $\frac{\text{M}}{200}$, est complètement oxydée en 30 minutes. Les auteurs signalent d'ailleurs que l'action de l'acétaldéhyde varie suivant sa concentration et suivant la concentration en ions hydrogène. Pour

(1) WIELAND, B., 1912, 45, 2606, etc.

(2) WENSE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch.*, 1938-39, 191, 358.

certaines concentrations d'adrénaline, d'acétaldéhyde et d'ions H^+ , le phénomène peut devenir une action empêchante vis-à-vis de l'oxydation de l'adrénaline. Loin de constituer un fait unique, un tel renversement de l'action d'un catalyseur positif d'oxydation est un phénomène très général sur lequel ont insisté de nombreux auteurs, MOUREU et DUFRAISSE (1), DUPONT et ALLARD (2), etc...

BAYER et WENSE attribuent à une telle action catalytique la destruction rapide de l'adrénaline dans l'organisme. PHILPOT (3) s'élève contre cette opinion de l'inactivation physiologique de l'adrénaline par des peroxydes, en raison de ce que l'eau oxygénée est inactive sur l'adrénaline à pH 7, en absence de catalyseur. L'auteur estime que l'inactivation physiologique est un phénomène enzymatique et que l'intervention des peroxydes est peu probable. Nous avons examiné ce problème et constaté qu'en effet, l'eau oxygénée, mise en présence de solutions d'adrénaline en proportions diverses, dans des tampons phosphatés, à différents pH, est dénuée d'activité oxydante. Cependant des traces infinitésimales de cuivre catalysent l'oxydation de l'adrénaline par l'eau oxygénée, et se comportent à la façon d'une peroxydase végétale. Les valeurs de l'exposant d'hydrogène des milieux physiologiques — voisins de la neutralité — sont d'ailleurs particulièrement défavorables à cette catalyse qui est à son minimum à pH voisin de 7,2 (tampon de phosphates).

L'objection de PHILPOT ne paraît pas définitive en raison de ce que les conditions sont tout à fait différentes dans le cas où l'on met en présence de l'adrénaline un peroxyde stable comme l'eau oxygénée ou un système en pleine évolution comme l'est celui qui est constitué par un aldéhyde qui se peroxyde et oxyde à son tour d'autres molécules d'aldéhyde. La présence de peroxydases dans l'organisme prive d'ailleurs l'argument de PHILPOT de tout fondement solide.

Acide succinique.

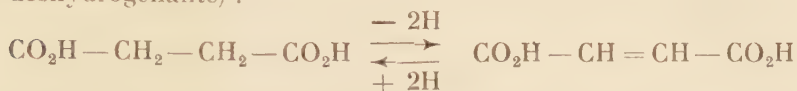
Un autre corps accélère fortement l'oxydation des solutions d'adrénaline exposées à l'air, c'est l'acide succinique.

(1) Cf. DUFRAISSE in GRIGNARD, *Traité de chimie organique*.

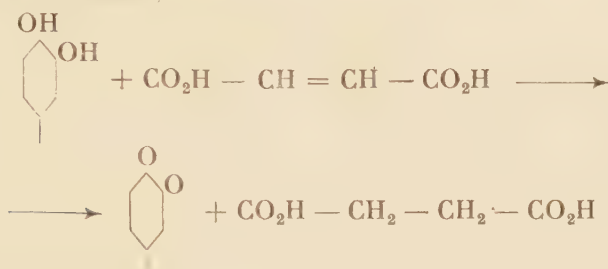
(2) DUPONT et ALLARD, *Bull. Soc. Chim.*, 1930, 47, 1216.

(3) PHILPOT, *J. physiol.*, 1940, 97, 301-7.

MARQUARDT (1) (1938-1940) a insisté dans plusieurs publications sur cette action catalytique de l'acide succinique. On sait que cet acide s'oxyde en donnant l'acide fumarique (oxydation déshydrogénante) :



et MARQUARDT a montré que cet équilibre peut être déplacé de droite à gauche par l'adrénaline ; l'acide fumarique déshydrogène l'adrénaline,



qui se trouve oxydée en quinone. On conçoit donc que la présence d'acide succinique puisse catalyser l'oxydation de l'adrénaline par l'oxygène moléculaire.

EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

Au moyen de mesures spectrophotométriques, j'ai étudié l'action du succinate et du fumarate de potassium sur l'autoxydation des solutions d'adrénaline, en solutions tamponnées aux phosphates, et en présence de traces de cuivre pour accélérer la réaction d'autoxydation.

Or, tandis que le succinate catalyse fortement la production d'adrénochrome, même si la solution est préparée au moment de l'emploi, au contraire, le fumarate est sans action sur la vitesse de formation de l'adrénochrome.

Cette observation n'est pas en accord avec la théorie de la déshydrogénation de l'adrénaline par l'acide fumarique, de MARQUARDT. Il semble donc que si cette théorie peut être valable en absence d'oxygène, elle ne peut pourtant pas s'appliquer à la catalyse de l'autoxydation à l'air.

C'est le moment de rappeler que WIELAND lui-même a signalé,

(1) MARQUARDT PETER, *Klin. Wochschr.*, 1938, 17, 1445-6 ; *ibid.*, 1939, 1, 252-3 ; *Enzymologia*, 1939, 6 ; *Z. exp. Med.*, 1940, 107-179-83.

à propos des aldéhydes, que, même dans le cas où la déshydrogénation est possible, *en présence d'oxygène, la voie d'oxydation la plus rapide passe par le peroxyde (ou le peracide).*

WENSE (1) (1939) montre en effet que l'inactivation de l'adrénaline par les solutions d'acide succinique ou d'acide fumarique est liée à leur teneur en peroxyde. La cocaïne et la spartéine, que le même auteur avait déjà trouvées être des inhibiteurs de l'oxydation de l'adrénaline par les aldéhydes peroxydés, ont également une action inhibitrice vis-à-vis de l'oxydation de l'adrénaline par l'oxygène en présence d'acide succinique ou d'acide fumarique.

Il faut rappeler que ces substances (la cocaïne en particulier) augmentent fortement l'activité physiologique de l'adrénaline, et WENSE a insisté sur le fait qu'elles agissent alors vraisemblablement en préservant l'adrénaline de son oxydation par des peroxydes organiques.

Les travaux de BAYER et WENSE, MARQUARDT, WENSE, permettent donc de conclure à une certaine vraisemblance de l'intervention des formes peroxydées des aldéhydes et de l'acide succinique (ou de l'acide fumarique) dans la catalyse de l'oxydation à l'air des solutions d'adrénaline. On ne saurait cependant rejeter complètement l'hypothèse d'une déshydrogénation de l'adrénaline par un produit de déshydrogénation du catalyseur (par exemple l'acide fumarique dans l'exemple étudié par MARQUARDT). D'ailleurs SEITZ (1939) (2) a montré que la réaction inverse : déshydrogénation catalytique de l'aldéhyde glycérique par l'adrénaline, dans un système comportant du bleu de méthylène comme accepteur d'hydrogène, est parfaitement possible. Cependant, la catalyse par formation de peroxyde primaire du catalyseur nous paraît plus probable, compte tenu de la vitesse de la réaction. L'objection de PHILPOT, à savoir que l'eau oxygénée n'oxyde pas l'adrénaline ne semble pas devoir être retenue (différence entre un peroxyde stable, et un système en évolution comportant une forme peroxydique intermédiaire).

D'ailleurs la présence de traces de cuivre dans l'eau distillée servant aux expériences suffirait à permettre l'oxydation par un peroxyde stable, ainsi que nous l'avons constaté (L'élimination

(1) WENSE, *Hoppe Seyler's Z.*, 1939, 260, 100-104.

(2) SEITZ, *Z. exp. Med.*, 1939, 105, 559-576.

des dernières traces de cuivre étant d'autre part pratiquement impossible à réaliser).

Bleu de méthylène.

DE MERRIT WELCH (1) (1934) a montré que le bleu de méthylène accélère l'autoxydation de l'adrénaline ; il s'agit vraisemblablement, d'après l'auteur, d'une déshydrogénation de l'adrénaline et du transport de cet hydrogène entre l'adrénaline et l'oxygène moléculaire. Il faut d'ailleurs noter que le potentiel normal d'oxydo réduction du bleu de méthylène est très inférieur à celui de l'adrénaline. Pourtant on ne saurait tenir compte dans de telles études de la valeur du potentiel normal de l'adrénaline. BLIX, cité par BALL et CHEN (2) a rapporté que les indophénols (dibromophénol- et orthocrésol, sont réduits par l'adrénaline à pH 7. Cependant, comme le font remarquer ces auteurs, à pH 7, des quantités équivalentes d'adrénaline et de 2-6 dichlorophénol indophénol réagissent de telle manière que initialement, environ 0,1 % de l'indicateur soit réduit et que la quantité équivalente d'adrénaline soit oxydée. Mais la forme oxydée de l'adrénaline (la quinone) se décompose rapidement et pour maintenir le niveau énergétique, une nouvelle réaction survient. Par la constante élimination de l'adrénaline oxydée qui se décompose, la réaction se poursuit jusqu'au bout en assurant la complète réduction de l'indicateur.

Ce phénomène nous paraît extrêmement important et mérite d'être noté pour les développements ultérieurs.

Hydroquinone.

L'action de l'hydroquinone sur l'autoxydation de l'adrénaline a été envisagée par BAUR et OBRECHT (3). Ces auteurs ont utilisé la méthode manométrique pour la détermination de l'oxygène absorbé au cours de l'autoxydation. Ils ont comparé les courbes de l'absorption d'oxygène dans le temps, par des solutions tam-

(1) DE MERRIT WELCH, *Am. J. Physiol.*, 1934, 108, 360.

(2) BALL et CHEN, *loc. cit.*

(3) BAUR et OBRECHT, *Z. Physik. Chem.*, 1936, 32, 65 ; OBRECHT, *Über die Inhibition der Oxydation von Adrenalin und von Cupro- und Ferrochlorid*. Zurich, Feldegg A. G., 1939.

ponnées d'adrénaline pure et par les mêmes solutions additionnées d'un mélange, à parties égales, d'hydroquinone et de quinone (pH 8,3 ; tampon de phosphates ; concentration de l'adrénaline : $3,3 \cdot 10^{-4}$).

A la concentration de 10^{-6} le système quinone-hydroquinone est pratiquement sans action sur l'autoxydation de l'adrénaline. (Il y a une très légère inhibition). A partir de la concentration 10^{-4} il y a une forte augmentation de la vitesse d'absorption d'oxygène, absorption qui est encore plus considérable à la concentration de 10^{-3} . Les auteurs estiment que cet accroissement de la consommation d'oxygène est à mettre au compte de l'hydroquinone qui s'oxyde en quinone. Le phénomène leur paraît cependant bizarre parce que l'hydroquinone est connue comme un désensibilisateur (OUELLET) (1). Autrement dit, en effet, l'hydroquinone se comporte généralement comme le plus actif des corps à propriétés antioxygènes.

Vis-à-vis des solutions d'adrénaline, l'hydroquinone a été à mainte reprise considérée comme antioxygène par BACQ (2) de même que le pyrocatechol et le pyrogallol.

Les catalyseurs négatifs de l'autoxydation de l'adrénaline, seront examinés dans le chapitre suivant ; nous réserverons donc pour l'instant ce côté de la question.

EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

Nous avons cru devoir reprendre l'étude de l'action de l'hydroquinone sur l'autoxydation de l'adrénaline.

Pour cette étude, l'intensité de la teinte rouge conférée aux solutions par la présence de l'adrénochrome a servi de mesure de l'oxydation des solutions d'adrénaline. Un appareil optique, à cellules photoélectriques, de notre conception, a été utilisé dans ce but.

Dans des tubes à essais en Pyrex de 200×20 mm., on introduit 20 cc. de mélange tampon phosphaté de pH 7,7 ; 0 mgr. 5 d'adrénaline, à l'état de chlorhydrate, et 0,05 mgr. de cuivre à l'état de chlorure CuCl_2 (soit à la concentration de $2,5 \cdot 10^{-6}$) pour accélérer la réaction d'oxydation de l'adrénaline. Des quantités variables d'hydroquinone sont introduites dans les tubes de

(1) OUELLET, *Helv. Chim. Acta*, 1931, 14, 936.

(2) BACQ, *Arch. Intern. Physiol.*, 1936, 42, 340 ; 1936, 44, 15.

manière à obtenir les concentrations de : 0 ; $1,25.10^{-6}$; $0,5.10^{-5}$ et $0,25.10^{-4}$, la concentration en adrénaline étant partout la même et égale à $0,25.10^{-4}$.

Les tubes sont agités à la main d'une façon égale pour tous, légèrement bouchés au coton hydrophile et maintenus à température constante (+ 34°C.).

Dans les tubes témoins d'adrénaline s'oxydant progressivement, la solution devient rose, puis rouge. Mesurée en lumière verte, l'absorption de la lumière croît donc pendant un certain temps. Cependant l'adrénochrome lui-même subit une oxyda-

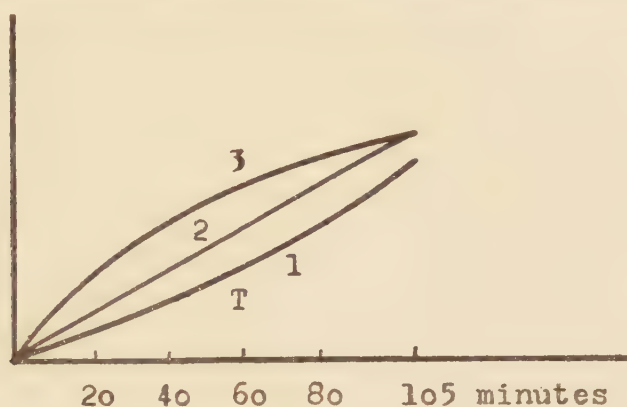


Fig. 6. — Densités optiques en fonction du temps.

tion qui le conduit progressivement à l'état de mélanine. Le taux d'adrénaline s'épuisant il vient un moment où la vitesse de formation de l'adrénochrome devient égale à sa vitesse de destruction, puis inférieure à celle-ci. La courbe s'infléchit alors doucement vers l'axe des abscisses.

La courbe de l'absorption lumineuse présente donc un maximum correspondant à la plus grande concentration en adrénochrome.

Sur la figure ci-dessus, représentant les courbes d'absorption lumineuse en lumière verte, courbes arrêtées au temps correspondant à 105 minutes, on notera que le maximum n'est pas encore atteint par la solution d'adrénaline sans hydroquinone. Il en est de même pour la solution comportant $1,25.10^{-6}$ d'hydroquinone, dont la courbe est confondue avec celle du témoin.

Pour la solution d'adrénaline avec $0,5.10^{-5}$ d'hydroquinone, il y a accélération très nette de l'absorption lumineuse ; cette

accélération est encore plus considérable pour la concentration d'hydroquinone $0,25 \cdot 10^{-4}$. Au temps 45 min., par exemple, les concentrations en adrénochrome exprimées en pour 100 du témoin sont respectivement 152 et 210. En 45 m. la quantité d'adrénochrome formé a été plus que doublée par $0,25 \cdot 10^{-4}$ d'hydroquinone, soit à masses égales d'hydroquinone et d'adrénaline.

Ici la mesure spectrophotométrique nous permet d'affirmer que l'absorption lumineuse est bien à mettre au compte de l'adrénaline. En effet, on pourrait craindre que le produit d'oxydation de l'hydroquinone, qui confère aux solutions une teinte voisine de celle de l'adrénochrome, nous amène à compter comme adrénochrome un produit dérivé de l'hydroquinone. Il n'en est rien, au temps 45 m. déjà pris en exemple, l'absorption lumineuse de solutions témoins ne comportant pas d'adrénaline, mais seulement de l'hydroquinone est négligeable et n'a pu être mesurée. De plus, l'absorption supplémentaire ne peut être imputée à une oxydation induite de l'hydroquinone par l'adrénaline au cours de son autoxydation ; en effet, l'absorption lumineuse présentée par les solutions T, 1, 2, 3, tombe au bout de 16 heures à des valeurs pratiquement identiques. La mélanisation de l'adrénaline a abouti au bout de ce temps à la même quantité de mélanine. Si des quantités très différentes de quinone et d'hydroquinone avaient pris naissance, ces produits relativement très stables conféreraient encore au bout de 16 heures des teintes très différentes aux solutions.

Alors que BAUR et OBRECHT trouvaient effectivement une absorption supplémentaire d'oxygène par les solutions d'adrénaline additionnées d'hydroquinone, mais étaient incapables de préciser si cette extra-oxydation était à mettre au compte de l'hydroquinone ou non, la mesure spectrophotométrique, si elle est, comme nous le pensons valable, permet de conclure à la *catalyse positive de l'autoxydation de l'adrénaline par l'hydroquinone*. Cette catalyse reste positive ou nulle, mais n'est jamais négative même à la concentration très faible de $1,25 \cdot 10^{-6}$.

Il est curieux de constater que si, dans nos expériences, la quantité d'adrénochrome formé en 45 m. est sensiblement doublée par la présence d'hydroquinone, dans les expériences d'OBRECHT (1), le volume d'oxygène absorbé dans les premières

(1) OBRECHT, *loc. cit.*, fig. 22, p. 37.

20 minutes, par une solution d'adrénaline additionnée d'hydroquinone-quinone dans une proportion très voisine (Adrénaline : $3,3 \cdot 10^{-4}$. Hydroquinone-quinone : 10^{-4}) est également très sensiblement doublé.

Pyrocatechol.

L'action du pyrocatechol sur l'autoxydation de l'adrénaline était également intéressante à étudier.

BACQ (1) s'exprime ainsi à propos de l'oxydation des solutions

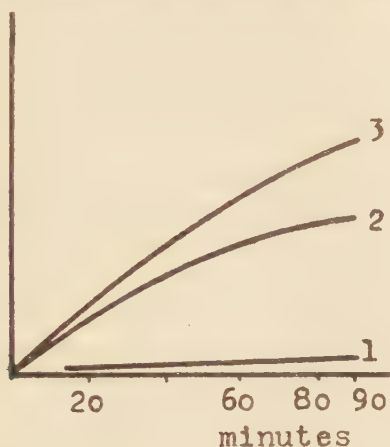


Fig. 7. — Densités optiques en fonction du temps.

d'adrénaline exposées à l'air : « Les antioxygènes, par exemple, le pyrogallol et le catéchol (2), ont la propriété d'empêcher, d'inhiber cette autoxydation en solution ».

EXPÉRIENCES PERSONNELLES.

J'ai fait avec le pyrocatechol des expériences analogues à celles qui sont ci-dessus décrites à propos de l'action de l'hydroquinone sur l'autoxydation de l'adrénaline. Une seule concentration du pyrocatechol (10^{-4}) a été essayée dans les mêmes conditions que plus haut (Voir fig. 7).

On notera que la concentration en adrénochrome obtenue au

(1) BACQ, *loc. cit.* et *l'Adrénaline et l'Acétylcholine. Leur rôle dans la transmission de l'influx nerveux*. Paris, Masson, 1937, p. 76.

(2) L'auteur veut dire « le pyrocatechol ».

bout de 45 minutes, en présence du pyrocatéchol est ici égale à 138 % du témoin.

Elle est moins importante que dans le cas de l'hydroquinone (210 %).

Cette action prooxygène du pyrocatéchol sur l'oxydation de l'adrénaline est d'autant plus remarquable que, d'après les déterminations de BALL et CHEN (1), le potentiel normal d'oxydo-réduction du pyrocatéchol est moins positif que le potentiel normal correspondant de l'adrénaline (A pH 7 et 30° on a pour le pyrocatéchol $E'_o = +0,360$ v et pour l'adrénaline $E'_o = +0,370$).

Les faits ici observés sont vraisemblablement à attribuer au fait que la quinone de l'adrénaline étant très instable, il n'y a jamais d'équilibre entre cette forme oxydée et l'adrénaline proprement dite.

(Sur la figure, l'absorption lumineuse due à l'oxydation du pyrocatéchol seul est figurée en 1 ; en 2 l'absorption en lumière verte de la solution témoin d'adrénaline ; en 3 l'absorption du mélange pyrocatéchol-adrénaline).

On démontre expérimentalement, en mélangeant à parties égales les solutions 1 et 2, que l'absorption en lumière verte du mélange obtenu extemporanément au bout du temps 45 min., par exemple, est notablement inférieure à celle de la solution 3 où l'adrénaline et le pyrocatéchol ont évolué ensemble.

Les résultats ci-dessus décrits m'ont semblé suffisamment intéressants pour mériter un contrôle par la méthode micromanométrique de BARCROFT-WARBURG.

Disons tout de suite que les précédents résultats ont été confirmés et amplifiés. Les expériences micromanométriques ont été effectuées en solutions tamponnées soit aux phosphates, soit au borate-ClH, et, dans ce dernier tampon, en l'absence comme en présence de cuivre catalyseur.

I. — *Tampon phosphaté de pH 7,3. Cuivre catalyseur. T° : 27°3.*

L'expérience comporte trois séries de vases de WARBURG, renfermant chacun 2,8 cc. de solution et de la potasse dans l'ajutage central, en vue de fixer le CO₂ éventuellement libéré au cours des oxydations.

(1) BALL et CHEN, *loc. cit.*

Série	Tampon	Adrénaline	Pyrocatechol	Cuivre	Eau
1	2 cc.	0,3 cc. = 0 mgr. 549	0	0,2 cc. = 80 γ	0,3 cc.
2	2 cc.	0,3 cc. = 0 mgr. 549	0,3 cc. = 0,6 mgr.	0,2 cc. = 80 γ	0
3	2 cc.	0	0,3 cc. = 0,6 mgr.	0,2 cc. = 80 γ	0,3 cc.

Sur le graphique ci-joint (Fig. 8) on trouvera les courbes résultant des moyennes des chiffres d'absorption de l'oxygène (expériences faites en double) par le pyrocatechol seul, l'adrénaline seule, et le mélange adrénaline-pyrocatechol. On notera qu'à ce pH et en présence de cuivre l'oxydation du pyrocatechol est, pendant les 45 premières minutes, plus rapide que celle de

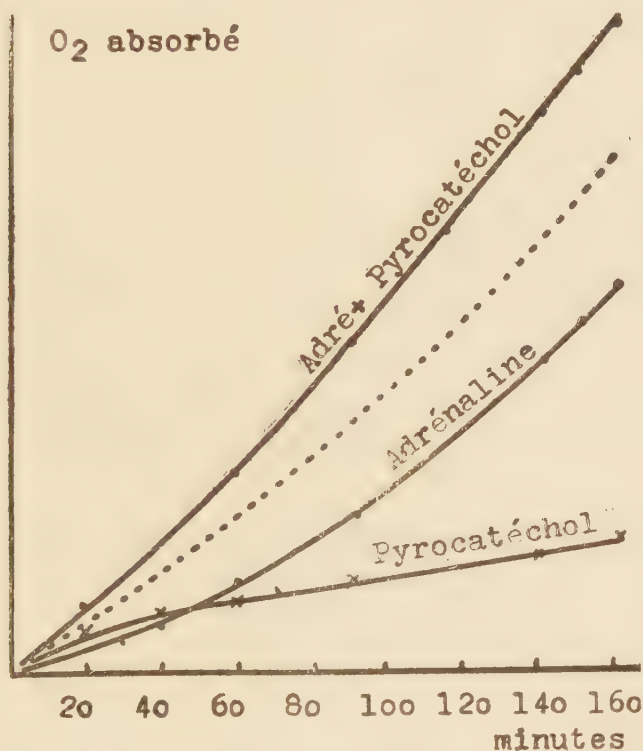


FIG. 8. — Courbes d'absorption de l'oxygène par le pyrocatechol, l'adrénaline et le mélange des deux substances. En pointillé la courbe calculée de la somme des volumes absorbés par l'adrénaline et le pyrocatechol, pris séparément.

l'adrénaline, et qu'elle suit une courbe indiquant une vitesse décroissante.

L'oxydation de l'adrénaline va, au contraire en s'accéléralant, indiquant une réaction autocatalytique, vraisemblablement due à l'accumulation de l'adrénochrome.

L'oxydation du mélange adrénaline + pyrocatéchol met en évidence une consommation d'oxygène nettement supérieure à la somme des consommations par l'adrénaline seule et le pyrocatéchol seul. (Environ 31 % d'extra-consommation à la 100^e minute.)

(Notons que cette courbe d'absorption a, comme celle de l'adrénaline, une allure autocatalytique.)

Il y a donc, de toute évidence, catalyse de l'oxydation de l'une des substances par l'autre, ou catalyse positive réciproque.

Pour préciser les phénomènes, j'ai soumis les produits colorés de l'autoxydation à un examen optique, au moyen de l'électrophotomètre Meunier.

J'ai constaté que le produit d'oxydation de l'adrénaline, présente un rapport $\frac{B}{V}$ des densités optiques en lumière bleue et en lumière verte égal à $\frac{B}{V} = 1,92$. Dans les conditions de l'expérience, le même rapport $\frac{B}{V}$ des densités optiques, en lumière bleue et en lumière verte, du produit d'oxydation du pyrocatéchol revêt la valeur $\frac{B}{V} = 1,16$. Or, le rapport $\frac{B}{V}$ des mêmes densités optiques mesurées sur la solution comportant un mélange d'adrénaline et de pyrocatéchol est, en fin d'expérience, égal à $\frac{B}{V} = 1,92$.

Il est donc manifeste que le produit coloré qui prend naissance est le produit d'oxydation de l'adrénaline.

On est ainsi amené à la conclusion que le pyrocatéchol catalyse l'oxydation de l'adrénaline.

II. — Tampon boraté de pH 8,5. Pas de catalyseur. T° : 27,2.

Trois séries de vases renfermant chacun 2 cc. 6 de solution et de la potasse dans l'ajutage central afin de fixer le CO₂ susceptible d'être libéré.

Série	Tampon	Adrénaline	Pyrocatechol	Eau distillée
1	2 cc.	0,3 cc. = 0 mgr. 549	0	0,3 cc.
2	2 cc.	0,3 cc. = 0 mgr. 549	0,3 cc. = 0,60 mgr.	0
3	2 cc.	0	0,3 cc. = 0,60 mgr.	0,3 cc.

Les trois courbes d'absorption de l'oxygène sont représentées sur le graphique suivant et sur lequel se manifestent des faits très intéressants :

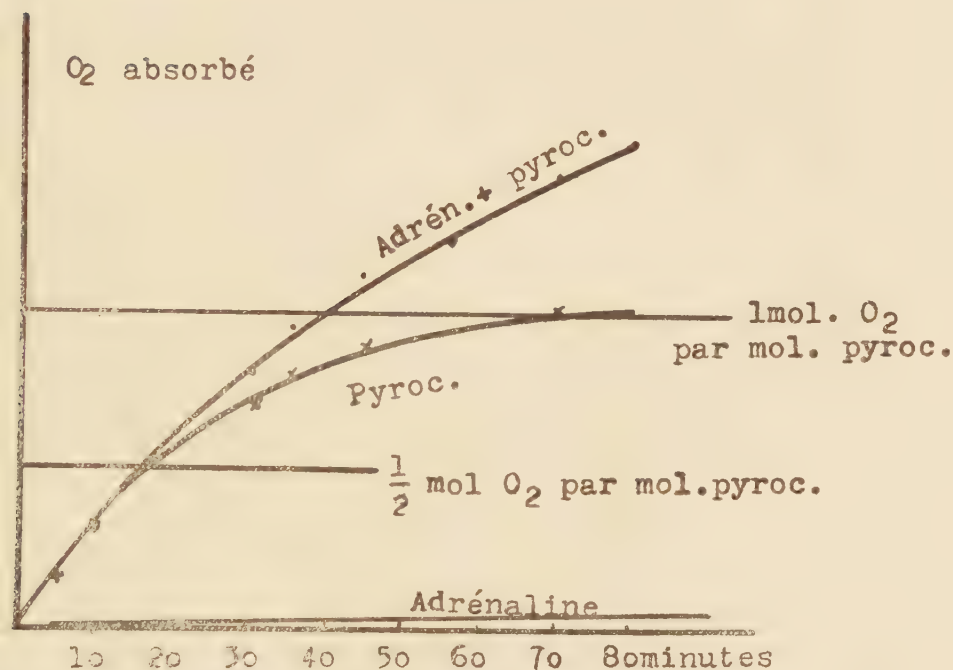


FIG. 9. — Courbes d'absorption de l'oxygène par l'adrénaline, le pyrocatechol et le mélange des deux substances.

1° Au cours des 100 premières minutes l'absorption d'oxygène par l'adrénaline est pratiquement nulle ;

2° Le pyrocatechol s'oxyde avec une vitesse appréciable, absorbant $\frac{1}{2}$ molécule d'oxygène par molécule de substrat en 17 minutes environ et une molécule au bout de 75 minutes.

L'oxydation du pyrocatechol se poursuit d'ailleurs au delà d'une molécule d'oxygène par molécule de diphénol ;

3° La courbe d'absorption de l'oxygène par le mélange de pyrocatechol et d'adrénaline est d'abord confondue avec la courbe d'absorption par le pyrocatechol seul. Dès qu'1/2 molécule d'oxygène par molécule de pyrocatechol a été fixée, donc lorsque tout le pyrocatechol est transformé en l'orthoquinone correspondante, la courbe s'écarte de la première : l'absorption d'oxygène est alors beaucoup plus rapide. Une molécule d'oxygène par molécule de pyrocatechol est alors fixée en 41 min. environ. Si l'on n'envisageait que ces deux dernières courbes, on serait tenté de conclure que la présence de l'adrénaline a provoqué une absorption supplémentaire d'oxygène par le pyrocatechol. On remarquerait cependant le fait difficilement explicable, dans cette hypothèse, que l'absorption ne devient plus importante qu'après la transformation du pyrocatechol en orthoquinone.

Mais si l'on examine les propriétés optiques des solutions on s'aperçoit que le spectre du mélange de pyrocatechol et d'adrénaline indique la prédominance du produit d'oxydation de l'adrénaline.

C'est donc l'orthoquinone du pyrocatechol qui se conduit comme catalyseur de l'oxydation de l'adrénaline : l'allure de l'absorption est celle du pyrocatechol tant qu'il reste de cette substance à oxyder en quinone ; plus tard, cette allure est celle de l'oxydo-réduction entre l'orthoquinone et l'adrénaline.

III. — Tampon boraté de pH 8,5. Cuivre catalyseur. $T = 27^{\circ},2$.

L'essai comporte, comme précédemment, trois séries de vases renfermant 2,8 cc. de solution et de la potasse dans l'ajutage central pour fixer le CO_2 éventuellement libéré au cours des oxydations.

S ^{ie}	Tampon	Adrénaline	Pyrocatechol	Eau distil.	Solution de Cu^{II}
1	2 cc.	0,3 cc. = 0 mgr. 549	0	0,3 cc.	0,2 cc. = 80 γ
2	2 cc.	0,3 cc. = 0 mgr. 549	0,3 cc. = 0,60 mgr.	0	0,2 cc. = 80 γ
3	2 cc.	0	0,3 cc. = 0,60 mgr.	0,3 cc.	0,2 cc. = 80 γ

Sur le graphique ci-après on trouvera les trois courbes d'absorption de l'oxygène par ces solutions : adrénaline seule, pyrocatéchol ; pyrocatéchol + adrénaline.

1° En présence de cuivre l'adrénaline s'oxyde avec une certaine vitesse.

2° Le pyrocatéchol s'oxyde d'abord plus rapidement qu'en absence de cuivre, mais l'oxydation devient ensuite moins rapide et n'atteint plus, au cours des 75 premières minutes, que $\frac{3}{4}$ molécule d' O_2 contre une molécule.

3° La courbe d'absorption de l'oxygène par le mélange de pyrocatéchol et d'adrénaline est d'abord située au-dessous de la courbe d'absorption par le pyrocatéchol. Elle coupe cette première courbe au point correspondant à l'absorption de $\frac{1}{2}$ molécule d'oxygène par molécule de pyrocatéchol, puis s'en écarte fortement. Si donc le mélange adrénaline-pyrocatéchol s'oxyde d'abord moins rapidement que le pyrocatéchol, dès que celui-ci est entièrement transformé en orthoquinone, l'oxydation devient beaucoup plus rapide.

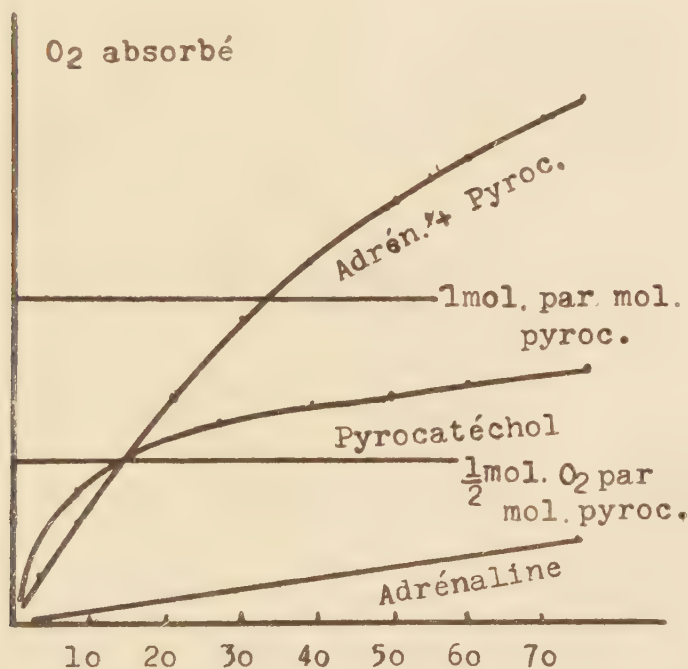


FIG. 10. — Courbes d'absorption de l'oxygène en présence de cuivre catalyseur.

L'adrénaline catalyse-t-elle d'abord négativement l'oxydation du pyrocatechol, puis l'accélère-t-elle après sa transformation en orthoquinone ?

Notons qu'en l'absence de cuivre, la présence de l'adrénaline ne modifiait pas la vitesse d'autoxydation du pyrocatechol tant que l'orthoquinone n'était pas formée.

Il semble plus logique d'admettre que l'adrénaline immobilise une partie des ions Cu et, partant, restreint la vitesse de la phase initiale d'oxydation du pyrocatechol. Dès que l'orthoquinone est formée, l'oxydoréduction intervient entre cette quinone et l'adrénaline. *En effet, les propriétés optiques de la solution montrent que le produit coloré est le produit d'oxydation de l'adrénaline.*

Si maintenant nous comparons les deux courbes d'absorption de l'oxygène par le mélange de pyrocatechol et d'adrénaline nous constatons que la vitesse d'oxydation est toujours supérieure en présence de cuivre. On en conclura que le cuivre catalyse l'oxydoréduction entre la quinone du pyrocatechol et l'adrénaline.

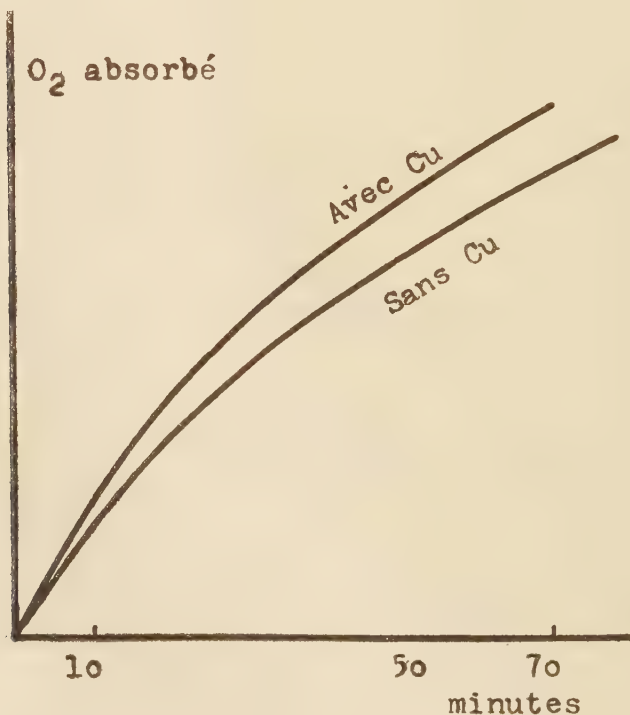


FIG. 11.

Résorcinol.

Nous avons également recherché, dans des conditions expérimentales analogues, l'action du résorcinol sur l'autoxydation de l'adrénaline (Réactions accélérées par le Cu à la concentration de : 2.10^{-6}).

La résorcine ne subit pas d'autoxydation mesurable.

Le mélange d'adrénaline ($0,25.10^{-4}$) et de résorcine ($0,25.10^{-4}$) passe plus rapidement au rose et au rouge.

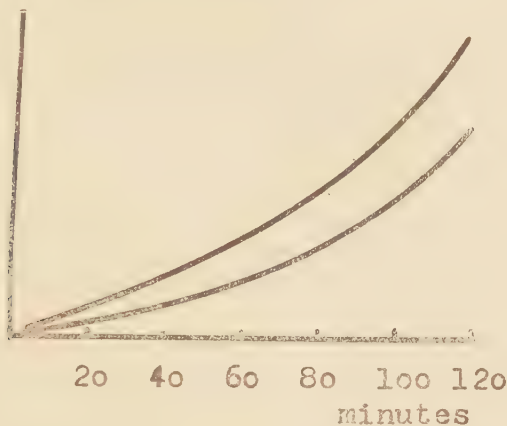


FIG. 12. — Courbes de variation de la densité optique de la solution d'adrénaline, en présence de deux concentrations différentes en résorcinol.

Ces deux dernières solutions sont totalement décolorées, au temps 120 m., par addition d'hydrosulfite de sodium, ce qui permet de penser que l'absorption lumineuse qu'elles présentent dans le vert est due dans l'un et l'autre cas à l'adrénochrome.

Nous concluons à une action prooxygène du résorcinol sur l'autoxydation de l'adrénaline.

Une certaine réserve semble devoir être faite en raison de la formation de produits de condensation qui se manifestent à la longue, par la fluorescence de la solution (au bout de 4 heures par exemple). La catalyse positive paraît certaine, au moins au début.

* * *

L'adrénaline s'autoxydant comme un dérivé du pyrocatechol, et son autoxydation étant catalysée par la présence d'hydroquinone nous avons été conduit à rechercher l'action de l'hydroquinone sur l'autoxydation du pyrocatechol lui-même. Sur la

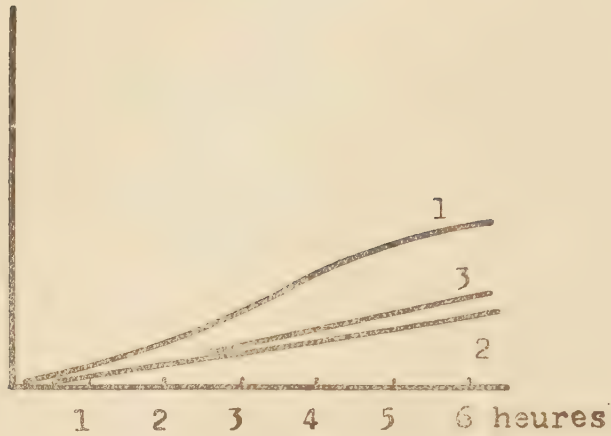


FIG. 13. — Courbes des densités optiques des solutions.

1. d'hydroquinone.
2. de pyrocatechol.
3. d'un mélange des deux substances.

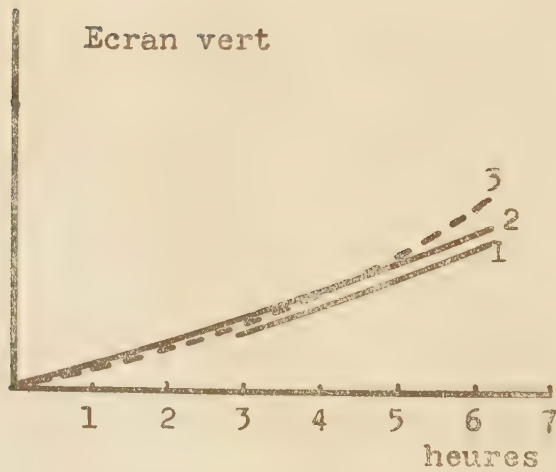


FIG. 14. — Courbes des densités optiques du pyrocatechol, de l'hydroquinone et du mélange des deux substances.

1. 2 mgr. de pyrocatechol.
2. 1 mgr. d'hydroquinone.
3. 2 mgr. de pyrocatechol, 1 mgr. d'hydroquinone.

fig. 13 sont représentées les courbes d'absorption lumineuse — en lumière verte — et en fonction du temps : 1° d'une solution tamponnée à pH 7,7 de phosphates, d'hydroquinone ($C = 10^{-4}$) ; 2° d'une solution de pyrocatéchol dans les mêmes conditions ($C = 10^{-4}$) ; 3° d'une solution renfermant à la fois le pyrocatéchol et l'hydroquinone, à la même concentration. On voit nettement sur cette figure, l'action inhibitrice du pyrocatéchol vis-à-vis de l'autoxydation de l'hydroquinone. (Le cuivre est toujours utilisé pour accélérer les réactions ($C = 2.10^{-6}$). Il en est d'ailleurs de même pour d'autres concentrations relatives de l'hydroquinone et du pyrocatéchol.

Bien que l'allure des courbes rende très probable une action réciproque d'inhibition de l'autoxydation du pyrocatéchol par l'hydroquinone, la démonstration de la réciprocité n'a pu être apportée, par ce processus expérimental, de façon indubitable (Voir fig. 14).

Action des produits primaires d'oxydation de l'adrénaline.

KISCH (1) a montré, en 1930, qu'il se forme, au cours de l'autoxydation des solutions d'adrénaline, un produit qui colore la solution en rose et qui peut être séparé par adsorption sur du charbon. Après élution, ce corps, désigné par l'auteur sous le nom de substance ω , est susceptible d'accélérer l'autoxydation de solutions d'adrénaline fraîches, même en milieu acide et à concentrations extrêmement faibles (10^{-10}). Le corps ω de KISCH serait vraisemblablement une quinone.

Rôle de l'adrénochrome.

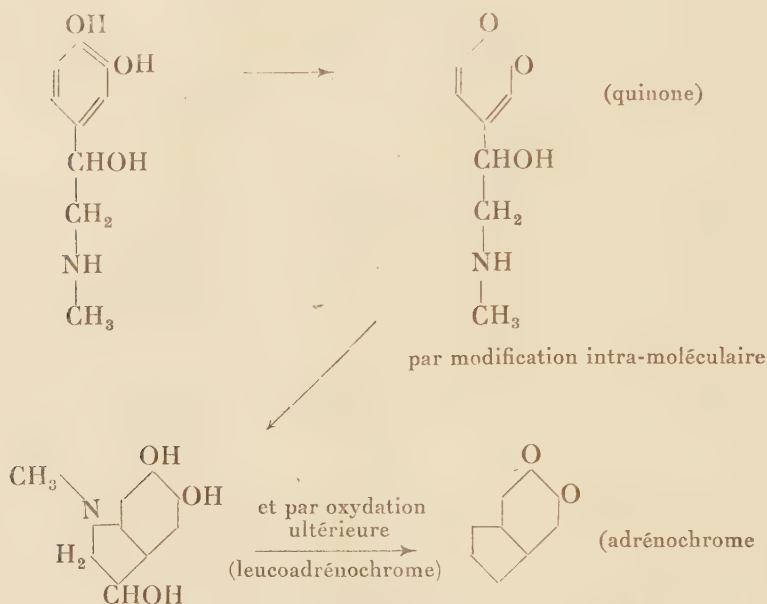
A la lumière des travaux récents, spécialement de ceux de l'Ecole Anglaise (Voir chapitre I), il apparaît que le « corps ω » doit être identifié à l'adrénochrome dont la nature orthoquinonique a été établie. On sait que les dérivés orthoquinoniques sont des oxydants très puissants ; des exemples de cette propriété ont été donnés par WILLSTÄTTER (2) à propos de la quinone du pyrocatéchol. SZENT-GYÖRGYI (3) a beaucoup insisté sur

(1) KISCH, *Biochem. Z.*, 1930, 220, 84-91 ; 1930, 220, 97-116 ; 1931, 236, 380-6.

(2) Voir chapitre I

(3) SZENT-GYÖRGYI, *Biochem. Z.*, 1925, 162, 399.

ces propriétés oxydantes et a attribué à la formation enzymatique d'orthoquinones la possibilité d'oxydations biochimiques importantes. La formation de l'adrénochrome peut être schématisée de la façon suivante en prenant pour modèle l'oxydation de la tyrosine d'après RAPER (1).



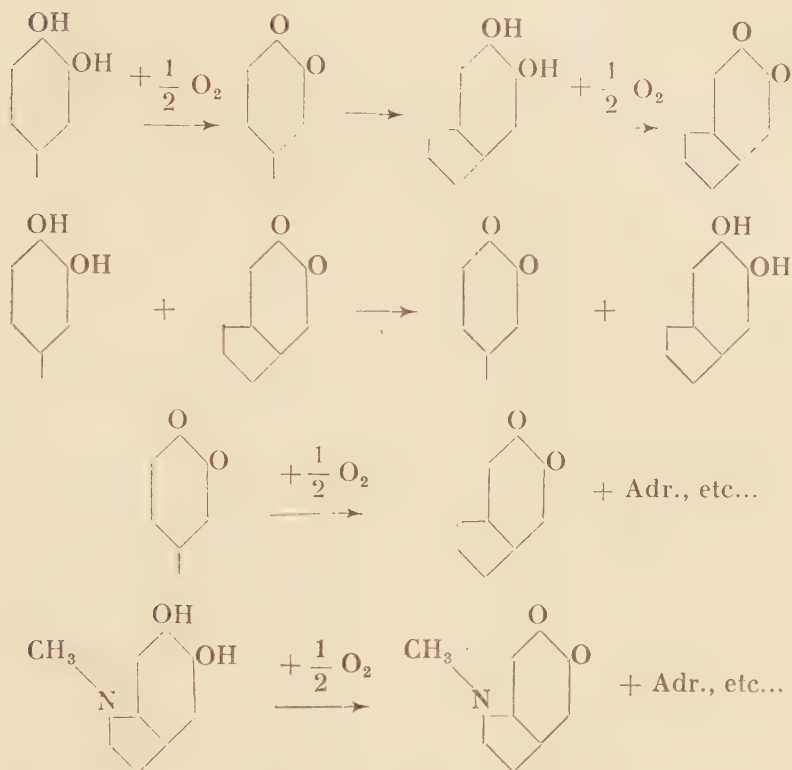
On notera que la formation d'adrénochrome correspond à l'utilisation d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline. Ce corps possédant la structure orthoquinonique est un oxydant qui, en présence d'un donateur d'hydrogène, par exemple en présence d'acide ascorbique, est réduit à l'état de leuco-adrénochrome. Il est également réduit par l'hydrosulfite, par SO_2 , par H_2S ou par l'hydrogène en présence de Pd, en donnant un leucodérivé qui montre avec le chlorure ferrique les réactions colorées d'un dérivé du pyrocatechol.

Il n'est donc pas impossible de considérer l'adrénochrome comme susceptible de déshydrogéner l'adrénaline elle-même pour l'amener au stade de quinone très instable qui se transforme rapidement en adrénochrome. Suivant cette conception l'adrénochrome est un véritable catalyseur de l'oxydation de

(1) RAPER, *Ergebn. der. Enzymforsch.*, I Band, 1932, p. 270. Voir aussi PUGH et RAPER, *Biochem. J.*, 1927, 21, 1370.

l'adrénaline, il constitue « l'autoxydateur » au cours des réactions d'autoxydation.

Le schéma suivant rend compte de ce mécanisme :



On conçoit donc que la formation d'adrénochrome dans le milieu puisse catalyser l'autoxydation, et que l'allure de cette réaction puisse être celle d'une réaction autocatalytique. Cette allure de réaction autocatalytique est présentée par les courbes d'absorption de l'oxygène dont on trouvera des exemples au chapitre suivant et par les courbes représentant les variations de densité optique des solutions d'adrénaline au début de leur autoxydation.

Il s'agit ici à notre avis, d'un cas extrêmement intéressant d'autocatalyse d'oxydation, en ce qu'il s'écarte beaucoup des schémas précédemment décrits pour la description de tels phénomènes.

Comme l'ont rappelé DUPONT et LÉVY (1), la définition de l'au-

(1) DUPONT et LÉVY, *Bull. Soc. Chim.*, 1930, 47, 60.

toxydation a été donnée par MOUREU et DUFRAISSE comme « la partie du phénomène de l'oxydation par l'oxygène libre où interviennent des peroxydes ».



DUPONT et LÉVY (1) ont montré, sur l'exemple de l'autoxydation de l'acide abiétique, qu'un mécanisme différent est capable d'intervenir, car il existe un oxyde intermédiaire $A(O)$ susceptible de fixer l'oxygène de l'air :



et d'oxyder A :



en donnant des molécules $A(O)$ se comportant comme catalyseurs.

Nous réserverons pour l'instant la question de savoir s'il se forme un peroxyde dans l'autoxydation de l'adrénaline. Si nous tenons compte seulement du premier produit identifiable de cette autoxydation, nous constatons qu'il résulte d'une première déshydrogénation de la molécule d'adrénaline conduisant à la quinone (instable) $A \longrightarrow A - H_2$ qui, à la suite d'une transformation intra-moléculaire (cyclisation de la chaîne latérale) donne naissance à l'adrénochrome réduit, lui-même facilement déshydrogéné à l'air en donnant $(A - 2 H_2)$ (adrénochrome oxydé). C'est ce dernier corps qui se conduit comme catalyseur de l'autoxydation de l'adrénaline, en transportant l'hydrogène entre de nouvelles molécules d'adrénaline et l'oxygène libre.

On conçoit donc que la réaction d'oxydation aille en s'accéléralant à mesure que la concentration en adrénochrome augmente. Cependant, le catalyseur lui-même (adrénochrome) subit, pour une part, l'oxydation irréversible (mélanisation). Tandis que la concentration en adrénaline autoxydable diminue ; la concentration en adrénochrome passe donc par un maximum, d'où l'existence d'un point d'inflexion sur la courbe représentant le phénomène.

Si les conditions de milieu correspondent à une grande instabilité de l'adrénochrome, par exemple si le pH est élevé, celui-ci subit très rapidement l'oxydation irréversible, sa concentration n'augmente pas et par conséquent la vitesse de l'autoxydation

(2) DUPONT et LÉVY, *loc. cit.*

ne dépendant que de la concentration en adrénaline, décroît depuis le début de celle-ci.



Il est intéressant de noter que toutes les courbes publiées par OBRECHT (1) présentent l'allure 1 et que dans les expériences de cet auteur, le phénomène d'autocatalyse ne se manifeste pas, alors qu'il est évident (2) sur les courbes d'absorption que nous avons obtenues dans le tampon phosphaté de pH 7,3 et qu'il disparaît sur les courbes relatives à nos expériences dans le tampon boraté de pH 8,5.

Ions métalliques.

Dans la catalyse positive de l'autoxydation des solutions d'adrénaline, les ions métalliques lourds peuvent jouer un rôle considérable. Le rôle du fer est connu depuis longtemps, mal d'ailleurs.

DE MERRITT WELCH (2) (1934) a mesuré la consommation d'oxygène des solutions d'adrénaline agitées à l'air et trouvé qu'elle est accrue par la présence de traces de fer. Il vit d'ailleurs un phénomène très important : le fer accélère la phase primaire de l'oxydation, mais il ralentit sensiblement la vitesse de la dernière phase. Il en déduisit que, au cours de la conversion de l'adrénaline en quinone, l'hydrogène perdu s'unit à O_2 pour donner de l'eau oxygénée. Ainsi qu'il a été trouvé dans beaucoup de systèmes d'oxydation, le fer catalyse l'oxydation par H_2O_2 ; le peroxyde d'hydrogène formé oxyde donc, grâce au

(1) OBRECHT, *loc. cit.*

(2) DE MERRITT WELCH, *Am. J. of Physiol.*, 1934, 108, 360.

fer, une deuxième molécule d'adrénaline, ou une molécule déjà partiellement oxydée. Cependant l'effet inhibiteur du fer aux stades ultérieurs complice une telle hypothèse.

BAUR et OBRECHT (1) étudiant l'action du fer par manométrie de solutions d'adrénaline à la concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ M/L dans un tampon de phosphates de pH 8,3 ne trouvent jamais de catalyse positive pour les concentrations en Fe (à l'état de Cl_3Fe) étagées de $5 \cdot 10^{-6}$ à 10^{-3} . Au contraire, à la concentration de 10^{-3} il y a inhibition des $\frac{2}{3}$ environ, chiffre correspondant à 30 min.).

Le manganèse étudié par les mêmes auteurs, provoque uniquement une catalyse positive ; mais OBRECHT (2) montre une courbe d'inhibition par le $\text{SO}_4 \text{Mn } 10^{-2}$. Le cobalt comme le Mn, accélère ou ralentit, d'après OBRECHT, l'absorption de l'oxygène (catalyse positive à $2 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-3} ; catalyse négative à 10^{-6} et $5 \cdot 10^{-5}$ M/L. OBRECHT note d'ailleurs que, suivant la quantité de fer ajoutée à la solution d'adrénaline tamponnée, il se développe une coloration qui va du rose au lilas et au bleu violet. *Il pense qu'il s'établit un complexe qui peut être à l'origine de l'effet inhibiteur.* On insistera plus loin sur la signification de tels complexes.

Le cuivre a été également étudié par OBRECHT (Adrénaline $1/3 \cdot 10^{-3}$). Une catalyse fortement négative se manifeste aux faibles concentrations ($5 \cdot 10^{-6}$; 10^{-6} ; 10^{-4} M/L) tandis qu'une concentration égale à 10^{-3} (M/L) exerce un effet nettement positif.

Tels sont les très curieux résultats d'OBRECHT.

BHAGRAT et RICHTER (3) (1938) ont également examiné la catalyse de l'oxydation à l'air des solutions d'adrénaline. Leur méthode est aussi la méthode manométrique. Mais ils opéraient sur des solutions d'adrénaline beaucoup plus concentrées. Leurs résultats sont résumés ci-dessous ; les chiffres exprimant en μ l/heure les volumes d'oxygène absorbés à pH 7, et 30°C , par un mélange de 0,2 cc. d'adrénaline M/4, 2 cc. de tampon de phosphates M/15 et 0,2 mgr. de métal : (91 γ de Cu par cc.).

Métal.	0	Cu	Fe	Ni	CO	Mn
O ₂ absorbé . . .	6	115	55	266	251	2

(1) BAUR et OBRECHT, *loc. cit.*

(2) OBRECHT, *loc. cit.*

(3) BHAGRAT et RICHTER, *Biochem. J.*, 1938, 32, 1937.

Seul le manganèse exerce donc une inhibition ; les autres métaux étant des catalyseurs positifs dans l'ordre croissant d'activités : Fe, Cu, Co, Ni.

Le résultat concernant le fer est en contradiction nette avec ceux d'OBRECHT. Quant à celui qui intéresse le cuivre, utilisé ici à la concentration de $1.4.10^{-3}$, il est compatible avec celui d'OBRECHT (action positive à la concentration de 10^{-3}). Si l'on calcule les proportions du métal par rapport à l'adrénaline, on trouve, en ce qui concerne le cuivre, pour OBRECHT :

Concentrations	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Cu : } 10^{-6} \quad 10^{-4} \quad 10^{-3} \quad (\text{ML}) \\ \text{Adrénaline } 1 \quad 3.10^3 \quad 1/3.10^3 \end{array} \right.$		
Cu/Adrénaline :	$\frac{3}{1.000}$	$\frac{3}{10}$	3

Dans les expériences d'OBRECHT, le cuivre ne devient catalyseur positif que dans la proportion de 3 atomes contre 1 molécule d'adrénaline.

Dans l'expérience de BHAGART et RICHTER, les concentrations sont les suivantes :

Cu (en moléc. gr.).....	$1.4.10^{-3}$
Adrénaline.....	$2.4.10^{-3}$
Cu/Adrénaline	$\frac{5,8}{100}$

Le rapport Cu/Adrénaline de l'expérience de BHAGRAT et RICHTER est donc compris dans la zone des valeurs réalisant une inhibition dans les expériences d'OBRECHT.

Les deux expériences qui sont compatibles, si l'on n'envisage que les concentrations en cuivre, ne le sont plus si l'on compare les rapports Cu/Adrénaline.

Les expériences de BHAGRAT et RICHTER sont faites en solution de phosphates M/15, pH 7 ; celles d'OBRECHT dans une solution de phosphates pH 8,3, M/15, par conséquent dans des milieux renfermant sensiblement la même quantité d'ions phosphoriques.

A notre avis on a trop souvent tendance à oublier le rôle possible des sels alcalins utilisés comme tampons du pH. Les comparaisons ne sont légitimes qu'entre solutions tamponnées par les mêmes sels.

Même lorsque les sels tampons sont identiques et les solutions de même pH, il est encore indispensable que ces sels soient à la même concentration. En effet, s'ils ont pour un ou

plusieurs des corps en présence, une certaine affinité, ils modifient par là même la concentration des ions de ces corps. C'est pourquoi la catalyse de l'oxydation de l'adrénaline par un ion métallique, en milieu tamponné, ne dépend pas seulement de la concentration en sel métallique ajouté et de la proportion de ce sel par rapport à l'adrénaline. Elle dépend en outre, de la proportion du métal par rapport à celle des ions acides du sel tampon susceptibles de former avec lui un précipité ou un complexe (Dans le complexe l'ion métallique peut se trouver immobilisé, ou, au contraire, activé). On conçoit donc que de tels systèmes (par exemple Cu^{++} , Phosphates, Adrénaline) se comportent différemment chaque fois que les proportions relatives des trois constituants sont modifiées (Voir plus loin : chapitre inhibition).

. * .

Notre attention a été attirée sur le cuivre comme catalyseur de l'oxydation à l'air de l'adrénaline, à l'occasion de recherches physiologiques. De telles recherches nécessitent la préparation de solutions très diluées de cette substance, jusqu'à 1 γ par cc., soit, en poids : 10^{-9} . Tandis que de telles solutions se conservent assez bien lorsqu'elles sont préparées avec de l'eau distillée dans un appareil en verre Pyrex, les solutions faites à partir d'eau distillée dans un alambic ordinaire deviennent très rapidement roses, puis rouges, même en milieu légèrement acide et à l'obscurité. Leur activité physiologique décroît dans la même mesure, avec le temps. On sait que l'eau distillée dans des alambics ordinaires renferme toujours des traces de cuivre.

Au cours de ces recherches, nous avons souvent utilisé pour tester l'activité des agents pharmacodynamiques, des fragments d'organes isolés et suspendus dans un bain de liquide de tyrode auquel on ajoute la drogue à examiner. Or, nous avons constaté que les réponses d'un organe à la même quantité d'adrénaline ajoutée au bain sont sensiblement plus durables lorsque le bain de tyrode a été préparé avec de l'eau distillée dans un appareil en verre qu'elles ne le sont lorsque ce liquide a été fait à partir d'eau distillée dans l'alambic métallique. Comme nous avons démontré avec J. NEUMANN (1) que la durée de la réponse de l'organe (intestin isolé) est liée directement au maintien ou non de l'adrénaline sous forme active, nous avons

(1) LAVOLLAY, *C. R.*, 214, 287-290, 1942.

été amené à conclure que l'eau distillée dans un alambic en cuivre, confère au liquide de Tyrode la propriété de détruire plus rapidement l'adrénaline par oxydation.

D'ailleurs, l'addition de traces de cuivre à un tel bain rend encore plus brèves les réponses à la même quantité d'adrénaline, et la brièveté de celles-ci est fonction de la quantité de cuivre ajoutée.

Inversement, l'addition d'une substance dissimulatrice du cuivre, au bain de tyrode préparé à l'eau distillée dans l'alambic en cuivre, prolonge sensiblement la durée de la réponse à une quantité donnée d'adrénaline (Acide citrique par exemple). En outre, il est possible de contrebalancer l'action abrégée de petites quantités de cuivre ajoutées au bain, par des apports proportionnels d'acide citrique (L'acide tartrique a donné les mêmes résultats).

L'action catalytique positive des traces de cuivre est donc un fait indubitable, que nous vérifions à chaque occasion en suivant au spectrophotomètre la densité optique des solutions.

Cette catalyse est également mise en évidence par nos expériences manométriques. Sur la figure ci-après on trouvera la courbe d'absorption de l'oxygène par l'adrénaline (0,549 mgr.) dans le tampon boraté de pH 8,5 sans catalyseur (xxx) et avec 80 γ de Cu comme catalyseur (000). Le volume total est de 2,8 cc.

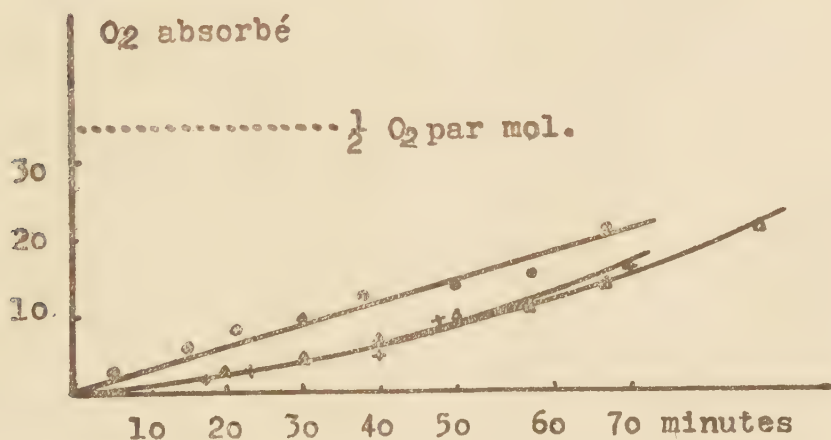


FIG. 15. — Courbes d'absorption de l'oxygène.

x x x Tampon boraté pH 8,5 sans catalyseur.

ooo — avec cuivre.

ΔΔΔ — phosphaté pH 7,3 avec cuivre.

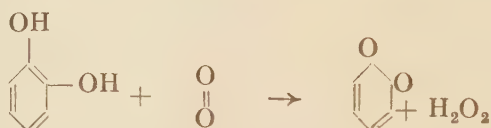
On notera que le cuivre accélère la réaction, surtout pendant les 50 premières minutes.

Il faut remarquer que la concentration du cuivre représente une concentration moléculaire de l'ordre de 5.10^{-4} .

Sur le même graphique, on a également figuré la courbe d'absorption d'oxygène de la même masse d'adrénaline, en solution dans le tampon de phosphates de pH 7,3 et en présence de 80 γ de cuivre. Cette courbe est pratiquement confondue avec celle de l'absorption d'oxygène par l'adrénaline en solution boratée pH 8,5, mais sans catalyseur.

En l'absence de Cu l'absorption d'oxygène dans le tampon phosphaté de PH 7,3 n'a pas pu être déterminée, elle est pratiquement négligeable dans les limites de temps ici envisagées.

Quel peut être le mécanisme de cette catalyse positive par les ions cuivre ? Il est possible de mettre en cause la formation de peroxyde d'hydrogène comme phase primaire de l'oxydation.



puisque le cuivre est connu comme un bon catalyseur de l'oxydation par H_2O_2 . Chaque molécule de peroxyde d'hydrogène pourrait ainsi, grâce au cuivre, oxyder une deuxième molécule d'adrénaline (1).

Nous avons cherché à vérifier la possibilité d'une telle réaction. Voici les résultats de cette étude :

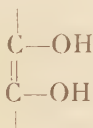
En absence de cuivre l'eau oxygénée n'oxyde pas l'adrénaline en solution dans le tampon de phosphates. L'addition au milieu de traces de cuivre assure effectivement l'oxydation de l'adrénaline aux dépens de H_2O_2 . La vitesse d'oxydation est à son minimum à pH 7,2 ; elle s'élève de part et d'autre de cette valeur de l'exposant d'hydrogène, et plus rapidement du côté acide que du côté basique. L'existence d'un minimum d'activité à pH 7,2 correspond vraisemblablement au minimum de dissociation de l'ion complexe que constitue le Cu^{++} avec l'ion PO_4^{--} .

(1) A propos de l'action peroxydasique du Cu, voir : BOURQUELOT et BOUGAULT, *J. pharm. et chim.*, 1897, 6, 120 ; THOMAS et CARPENTIER, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, 4, 143 ; ALOY et VALDIGUIÉ, *Bull. Soc.*, 1923, 33, 572.

Travaux de l'Ecole de Szent-Györgyi

SZENT-GYÖRGYI et ses collaborateurs (1) ont consacré une suite de mémoires très importants à « l'autoxydation déshydrogénante et les oxydations biologiques ». Ce très intéressant travail comporte un exposé des recherches faites par les auteurs sur les complexes organiques du fer et du cuivre; sur le rôle de ces complexes dans l'autoxydation, dans son inhibition et dans sa catalyse positive; enfin, une partie descriptive où le mécanisme intime de l'autoxydation catalysée par ces métaux est précisé. Voici la substance de ce travail :

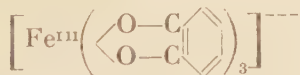
L'addition d'un sel ferreux à une solution neutre d'acide ascorbique donne naissance à une belle couleur violette (2). La couleur évolue, sous l'influence de l'oxygène, et est celle d'un oxyde du complexe primaire ferro-acide ascorbique. Elle disparaît par addition d'hydrosulfite et se rétablit par agitation à l'air. Cette réaction peut être obtenue avec la même intensité, avec le pyrocatechol et l'acide dihydroxymaléique, c'est-à-dire avec trois substances présentant le groupement énediol :



Les complexes donnés par le fer et le pyrocatechol ont été étudiés par WEINLAND et BINDER (3). Fe^{II} donne avec le diphenol, en solution neutre, un complexe incolore, qui s'oxyde rapidement à l'air en un complexe coloré du fer Fe^{III}. La couleur de ce dernier est rouge en milieu alcalin, violet en milieu neutre, vert en solution légèrement acide. La formule du complexe rouge est :



Il comprend l'ion complexe :



qui doit être rapproché de l'ion ferricyanure.

(1) BANGA, GERENDAS, LAKI, PAPP, PORGES, STRAUB et SZENT-GYÖRGYI, *Hoppe Seyler's*, 1938, 254, 147.

(2) SZENT-GYÖRGYI, *Hoppe Seyler's*, 1934, 225, 168.

(3) WEINLAND et BINDER, *Ber. chem. Ges.*, 1912, 45, 148, 1113.

Le complexe violet, formé en milieu neutre, contient deux molécules de pyrocatechol et une molécule d'eau. Il est très stable : le coefficient d'extinction de ses solutions ne varie pas, même par une très forte dilution (1) (BANGA). Sa dissociation est très faible ; pratiquement nulle en milieu neutre ou alcalin (2).

Ce complexe possède un potentiel d'oxydoréduction qui a été déterminé par LAKI et PAPP (3). Le ferrocatechol forme avec le ferricatechol un système redox dont le E'_0 à pH 5 ; est : $+0,293$ v, soit environ 100 mv plus négatif que le potentiel du système pyrocatechol-quinone.

WIELAND (4) (1935), WIELAND et FRANKE, avaient déjà insisté sur l'importance de la formation de complexes dans les phénomènes d'autoxydation, et signalé la possibilité pour l'oxygène d'être inclus momentanément à l'intérieur d'un complexe formé par un métal et par la substance à autoxyder.

Les déterminations de BANGA (5), de LAKI et PAPP (6), montrent que Fe^{II} ajouté au pyrocatechol est immédiatement lié et oxydé en Fe^{III} . L'oxydation de Fe^{II} en Fe^{III} ne s'effectuant normalement que très lentement à l'air, on doit conclure que l'atome de fer est activé et rendu très facilement autoxydable par son entrée dans le complexe. Une telle activation du métal par formation de complexe est un fait assez général (7).

Si une solution neutre de pyrocatechol est additionnée d'un sel ferreux, son autoxydation est accélérée. Pour SZENT-GYÖRGYI (8). Fe^{II} , d'abord lié au diphénol, subit l'autoxydation et est amené à l'état Fe^{III} . La solution ne contenant pratiquement pas d'ions Fe^{III} , l'oxydation du pyrocatechol ne se fait pas par Fe^{III} , mais par un transport intramoléculaire d'électrons entre Fe^{III} et le pyrocatechol.

Conformément à la théorie de WIELAND précédemment rappelée, une molécule O_2 est d'abord englobée dans le complexe. LAKI et PAPP (9), étudiant la réaction du complexe (Fe^{II} -pyroca-

(1) BANGA, *Hoppe Seyler's*, 1938, 254, 165.

(2) JELLINEK et GORGON, *Z. Physik. chem.*, 1924, 112, 207.

(3) LAKI et PAPP, *Hoppe Seyler's*, 1938, 254, 175.

(4) WIELAND, *L'oxygène, ses réactions chimiques et biologiques*. Paris, 1935.

(5) BANGA, *loc. cit.*

(6) LAKI et PAPP, *loc. cit.*

(7) Cf. JOB, Rapport au 2^e Conseil Solvay de Chimie. Bruxelles, 1925.

(8) SZENT-GYÖRGYI, *loc. cit.*

(9) LAKI et PAPP, *loc. cit.*

téchol) avec l'oxygène, ont en effet montré que l'autoxydation est inhibée par CO et que le degré d'inhibition peut être exprimé par une constante d'affinité ; ce qui démontre que la réaction primaire avec l'O₂ consiste en une liaison réversible avec cette molécule.

La réaction secondaire consisterait alors en un transport d'électrons, réalisé par le fer, entre le pyrocatéchol et l'oxygène, à l'intérieur du complexe.

LAKI et PAPP ont également montré deux faits importants : CO ou O₂ n'entrent pas en concurrence avec le pyrocatéchol pour se lier au fer, mais ces deux molécules CO et O₂ viennent satisfaire des valences coordinatives laissées libres par le pyrocatéchol.

D'autre part, le cyanure qui inhibe, comme CO, l'autoxydation du complexe, entre en concurrence avec le pyrocatéchol vis-à-vis du fer. Les inhibitions par CO et par CN⁻ sont donc d'essence très différente. Les 6 valences coordinatives du fer possèdent donc des affinités particulières.

Dans la théorie établie par SZENT GYÖRGYI, la réaction d'autoxydation $C_6H_4(OH)_2 + \frac{1}{2} O_2 \longrightarrow C_6H_4O_2 + H_2O$, catalysée par le fer, qui semble consister en un transport de l'H du pyrocatéchol sur l'oxygène, se décompose en la suite de réactions suivantes :

1° Dissociation du pyrocatéchol :



2° Formation du complexe avec le fer :



3° Liaison de l'oxygène par le complexe :



4° Déplacement d'électrons de Fe^{II} sur O₂ ; Fe^{II} $\longrightarrow$ Fe^{III}.

5° Déplacement d'électrons du pyrocatéchol sur Fe ; Fe^{III} $\longrightarrow$ Fe^{II}.

6°-12°. La répétition des réactions 4 et 5, à quatre reprises, amène la décharge de deux anions pyrocatéchol, le remaniement de leurs doubles liaisons et leur stabilisation à l'état de

quinone ; ils sont remplacés dans le complexe par de nouveaux anions du pyrocatéchol. L'oxygène ayant gagné 2 électrons se lie avec les ions H^+ de l'eau et donne H_2O_2 ; après la prise de 4 électrons il donne OH et H_2O . Mais, le peroxyde se liant au fer, et, en s'additionnant au complexe (Fe^{II} -pyrocatéchol) oxydant celui-ci en Fe^{III} -pyrocatéchol, on doit s'attendre à ce que la molécule O_2 ne quitte le complexe qu'après sa réduction en H_2O .

L'ensemble de ces réactions constitue donc une oxydoréduction entre le pyrocatéchol et l'oxygène, qui consiste en un transport d'électrons et non pas en un transport d'hydrogène.

BANGA (1) a montré qu'un très grand nombre de substances minérales ou organiques forment des complexes avec le fer ; toutes comportent deux groupements « formateurs de complexes » dans une position permettant la formation d'hétérocycles à 5 ou 6 chaînons. Les groupements *primaires* : carboxy, OH énolique, OH aromatique, entrent dans le complexe en échangeant une valence primaire après avoir dissocié leur H^+ . Les groupements *secondaires* : OH alcoolique et CO , se lient par une valence secondaire.

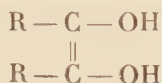
Les groupements primaires ont une structure commune représentée par $\text{>C} = OH$.

Dans les complexes formés par les substances organiques, il y a forte activation du fer qui est rendu fortement autoxydable. Dans les complexes formés par des substances minérales ou mixtes, il n'y a pas activation du fer (acide glycérophosphorique).

Pour que l'activation du fer aboutisse à l'oxydation de la fraction organique du complexe, il faut qu'un échange d'électrons ait lieu entre le fer et cette fraction. L'expérience montre que la structure de ces substances comporte nécessairement deux groupements de formateurs de complexes primaires. L'hydrogène est dissocié avant même la formation du complexe ; l'ion ainsi constitué, une fois incorporé dans le complexe, cède sa charge et se stabilise par un remaniement des doubles liaisons. Chez les diphénols, seuls les orthodiphénols répondent aux conditions requises (Pyrocatéchol et dérivés). Chez les dérivés diénoliques, la stabilisation du produit oxydé ne se ferait de façon simple que dans le cas où les doubles liaisons ne sont ni con-

(1) BANGA, *loc. cit.*

juguées, ni cumulées, mais où une liaison éthylénique existe entre deux C — OH voisins. Ce groupe, d'ailleurs très instable,



existe dans la molécule d'acide ascorbique (et de ses homologues) et dans celle de l'acide dihydroxymaléique. *Toutes ces substances sont, comme on sait, les principaux catalyseurs organiques de l'oxydation biochimique.*

La formation possible de complexes mixtes dans lesquels le fer se trouve lié à deux substances organiques ; ou simultanément, à une substance organique et à un formateur de complexes minéral, permet d'éclairer d'un jour nouveau l'action de certaines substances activant ou inhibant l'autoxydation.

Il est impossible de prévoir à l'avance l'effet de l'entrée d'une deuxième substance dans le complexe du fer (complexe Fe-pyrocatechol, par exemple). Prenons l'exemple du cyanure, dont l'effet inhibiteur vis-à-vis des autoxydations a généralement été invoqué comme une preuve de l'intervention du fer dans ces phénomènes (WARBURG). (Bien que plusieurs auteurs aient constaté souvent, à certaines concentrations, que l'ion CN- exerce une action positive sur l'oxydation) (1).

Le cyanure, mis en présence d'un sel ferrique, fournit un complexe très résistant qui n'est pas décoloré par addition de pyrocatechol. Si le sel ferrique n'a été maintenu que quelques secondes en présence du cyanure, il se forme un complexe réversible, lentement décoloré par le pyrocatechol.

Lorsque le sel ferrique est ajouté à un mélange de cyanure et de pyrocatechol, deux cas peuvent se présenter : si le cyanure est en excès il se forme du ferricyanure irréversible ; si c'est le pyrocatechol qui est en excès, il n'y a pas formation de ferricyanure.

« Cette formation par étape des sels complexes (fer-cyanure),
« dit BANGA, est... d'une très grande importance... On admet
« généralement que le cyanure, additionné à un système, immo-
« bilise le fer et doit l'inactiver dans sa fonction catalytique.
« Comme nous voyons, ce n'est pas le cas, et la mesure dans
« laquelle le fer est lié dépend de la masse relative et de l'affi-
« nité des autres formateurs de complexes ».

(1) BANGA, loc. cit.

GERENDAS a approfondi cette question et montré, à notre avis, le fait le plus important.

Etudiant l'autoxydation du sulfite de sodium en présence de fer (et de cuivre) il a trouvé que la plupart des substances ajoutées à de telles solutions inhibent l'autoxydation. Pour TIROFF (1) cela s'explique par une immobilisation du métal catalytique. C'est l'hypothèse la plus simple, d'ailleurs valable dans certains cas. Mais d'après GERENDAS (2), certaines substances, comme le cyanure, accélèrent fortement l'autoxydation du sulfite bien que n'étant pas elles-mêmes autoxydables.

« Si l'on ajoute, dit SZENT-GYÖRGYI (3), à un mélange de sulfite et du sel métallique, un deuxième formateur de complexes X, ce dernier entre en concurrence avec le sulfite vis-à-vis du fer. S'il occupe toutes les valences du fer, l'autoxydation doit cesser. Occupe-t-il seulement une partie des valences, il peut alors se former un complexe mixte : $X - Me - \text{Sulfite}$ ($Me = \text{métal}$). Nos connaissances théoriques sur l'atomistique de la formation des complexes sont insuffisantes pour prévoir dans quelle mesure l'entrée d'un deuxième radical dans le complexe ($Me - \text{Sulfite}$) influence ce dernier. Dans un premier cas, ce nouveau radical pourra empêcher la liaison de O_2 , ou inhiber l'échange des électrons entre le sulfite, Me et O_2 . Dans un autre cas, ces réactions pourront être facilitées par l'entrée du nouveau radical, et l'autoxydation sera favorisée ». Comme l'a montré GERENDAS, une même substance (4) peut favoriser l'autoxydation catalysée par Cu et inhiber l'autoxydation catalysée par Fe .

En outre, STRAUB (5), envisageant l'autoxydation comme un cas particulier de l'oxydoréduction, a démontré qu'entre le bleu de méthylène et l'acide ascorbique, il peut y avoir deux oxydoréductions différentes. L'une directe, qui peut être accélérée par la lumière et qui a pour point de départ des *molécules excitées* du colorant. L'autre, qui est catalysée par le cuivre. Le Cu entre en combinaison avec le colorant et arrête ainsi la réaction précédente tout en catalysant fortement l'oxydoréduction. Dans cette nouvelle réaction le bleu de méthylène remplacerait l' O_2

(1) TIROFF, *Z. physik. chem.*, 1903, 45, 641.

(2) GERENDAS, *loc. cit.*

(3) SZENT-GYÖRGYI, *loc. cit.*

(4) GERENDAS, *loc. cit.*

(5) STRAUB, *Hoppe Seyler's*, 1938, 254, 192.

à l'intérieur d'un complexe (Cu-Ac. ascorbique, B. M.). Il faut d'ailleurs rappeler que BLIX (1) (1927) avait démontré que la décoloration du bleu de méthylène par le fructose, en milieu phosphaté est catalysée par les métaux lourds, comme l'est la réaction avec les dérivés SH. Le Cu et le Fe M/10.000 abrègent le temps de décoloration de moitié. *Ce sont des faits tout à fait analogues à ceux que signale STRAUB en 1938.*

BANGA (2) a recherché, sur un nombre imposant de substances minérales et organiques, quelles sont celles qui peuvent donner des complexes avec le cuivre. Par de nombreux côtés ce métal se comporte de façon semblable au fer, avec quelques différences.

La méthode utilisée consiste à mettre en concurrence la substance étudiée et l'éthylène diamine qui donne avec le cuivre un complexe coloré. Dans l'étude des complexes du cuivre, l'éthylène diamine joue donc le rôle qui était dévolu au pyrocatéchol dans l'étude des complexes du fer.

Originalité et domaine de la théorie de Szent-Györgyi.

SZENT-GYÖRGYI fait justement remarquer que la théorie, ainsi établie, se limite à l'autoxydation déshydrogénante et que le mécanisme des autres autoxydations catalysées par des métaux (celle des aldéhydes, des composés non saturés, de l'hyposulfite) est vraisemblablement différente.

La théorie de SZENT-GYÖRGYI est extrêmement séduisante ; elle rend compte de phénomènes apparemment contradictoires et confère une belle unité à l'ensemble des autoxydations déshydrogénantes.

Elle présente en outre, une grande originalité. Il est juste pourtant de rappeler que l'importance de la formation de complexes entre la substance autoxydable, les ions métalliques et l'O₂ avait déjà été signalée par WIELAND (3). *La conception suivant laquelle l'H est dissocié avant la formation du complexe et celle de l'échange d'électrons entre la substance et l'oxygène par l'intermédiaire du métal est nouvelle. Pour WIELAND, l'hydrogène*

(1) BLIX, *Skand. Arch.*, 1927, 50, 8.

(2) BANGA, *loc. cit.*

(3) WIELAND, *L'oxygène, ses réactions chimiques et biologiques* Paris 1935.

du substrat organique était activé à la suite de l'entrée dans le complexe.

La notion de complexes-mixtes, comportant plus d'une espèce de molécules organiques, et devenant ainsi plus ou moins autoxydable, suivant la nature ou la proportion des molécules introduites, est également nouvelle et féconde.

Cependant, dès 1925, WIND (1) signalait que l'oxydation des sucres, catalysée par le Cu, est fortement inhibée par le pyrophosphate de sodium ; mais que, par contre, la catalyse de cette oxydation par le fer est accélérée de façon considérable par la même substance.

Or le pyrophosphate donne avec le fer des complexes stables étudiés par PASCAL (2) et l'empoisonnement de la catalyse d'autoxydation par le pyrophosphate a été considéré par WARBURG (3) comme caractéristique de l'intervention du fer dans le processus intéressé (autoxydation de la cystéine, par exemple). Les observations de BLIX étaient incompatibles avec cette propriété. Elles devinrent intelligibles à la suite des travaux de SPOEHR (4) qui montra que les solutions sucrées sont bien oxydées par l'oxygène à 38° en présence d'orthophosphate et de ferropyrophosphate de sodium (d'après PASCAL : $\text{Fe}_2 (\text{P}_2\text{O}_7)_3 \text{Na}_3$ et d'après SPOEHR et SMITH : $\text{Fe} (\text{P}_2\text{O}_7) \text{Na}_2$).

En rapprochant ces travaux on trouve donc déjà un exemple de la constitution d'un complexe du fer à propriétés oxydantes actives et cependant voisin d'un complexe où le fer est complètement inactivé.

Autre exemple : CH. DUFRAISSE (5) écrit : « Ainsi, l'inactivation, si fréquemment invoquée, du fer par l'acide cyanhydrique devrait avoir lieu par passage à un complexe inerte ; dès lors, les complexes tout formés et bien stables du fer et de l'acide cyanhydrique devraient, *a fortiori*, être dépourvus de tout pouvoir catalytique. Or, il n'en est rien : ferro et ferricyanures ont leur activité propre, positive ou négative suivant les cas (MOUREU,

(1) WIND, *Bioch. Z.*, 1925, 159, 58.

(2) PASCAL, *Ann. Chim. phys.* (8), 16, 359, 520, 1909.

(3) WARBURG et SAKUMA, *Pflüg. Arch.*, 1923, 200, 203 ; SAKUMA, *Biochem. Z.*, 1923, 142, 68.

(4) SPOEHR, *Am. Soc.*, 1924, 46, 1494 ; SPOEHR et SMITH, *Am. Soc.*, 1926, 48, 107, 236 ; FERNER, DEGERING et UPSON, *J. Biol. Chem.*, 1931, 94, 423 ; 1932, 95, 409.

(5) CH. DUFRAISSE in GRIGNARD, t. II, fasc II, p. 1147 et seq.

DUFRAISSE et BADOCHÉ) (1), (FRANKE (2)) et qui arrive même parfois à surpasser en pouvoir accélérateur les formes du fer réputées comme très actives. Il faut ajouter, d'autre part, que l'acide cyanhydrique ne se montre pas toujours antagoniste du fer (ROBINSON) (3) ».

Que certains formateurs de complexes avec les catalyseurs métalliques puissent donner naissance à des composés, suivant les cas, plus actifs ou moins actifs que le métal lui-même, c'est donc un fait depuis longtemps reconnu. Ce qui fait l'originalité de la théorie de Szent-Györgyi, c'est la notion de l'incorporation du substrat oxydable dans ces complexes et de l'autoxydabilité plus ou moins accentuée des complexes mixtes ainsi formés.

Les expériences personnelles qui vont être décrites ci-dessous, ont été entreprises pour éclaircir le rôle de petites quantités de cuivre dans l'autoxydation du pyrocatéchol en milieu tamponné.

Elles mettent en évidence quelques points qui apparaîtront remarquables à la lumière de la théorie de Szent-Györgyi.

. * .

Etude manométrique de l'autoxydation du pyrocatéchol.

Effets du cuivre sur la marche de l'oxydation.

RECHERCHES PERSONNELLES

J'ai étudié l'oxydation du pyrocatéchol par l'oxygène atmosphérique, en milieu tamponné, en mesurant par la méthode micromanométrique de BARCROFT-WARBURG les volumes d'oxygène absorbés par les solutions agitées à température constante en présence de l'air.

L'expérience est réalisée de la façon suivante : le vase de WARBURG renferme 2 cc. de tampon au borate ; 0,3 cc. = 0,6 mgr. de pyrocatéchol et 0,3 cc. d'eau (vol. total 2,6 cc.), température 27°2 ; pH 8,5 (Borax-ClH).

Les lectures sont faites toutes les 5 minutes. On trouvera sur le graphique suivant (Courbe I) la courbe représentant l'absorption de l'oxygène en fonction du temps. Les temps sont en abscisses ; l'expérience est arrêtée au bout de 75 minutes. En

(1) MOUREU, DUFRAISSE et BADOCHÉ, *C. R.*, 1926, 183, 685.

(2) FRANKE, *Ann.*, 1932, 498, 129.

(3) M. E. ROBINSON, *Biochem. J.*, 1924, 18, 255.

ordonnées on a porté les volumes d'oxygène absorbé, exprimés pour plus de clarté, en molécules d'oxygène par molécule de pyrocatechol (l'unité représente donc $134,4 \text{ mm}^3$ d' O_2 à la température de $27^{\circ}2$). On notera que le pyrocatechol fixe, dans ces conditions, $\frac{1}{2}$ molécule d'oxygène, correspondant à la formation de l'orthoquinone, en 17 minutes. Une molécule d'oxygène est absorbée en 35 minutes. La vitesse de réaction est constamment décroissante, et le phénomène présente l'allure d'une réaction monomoléculaire.

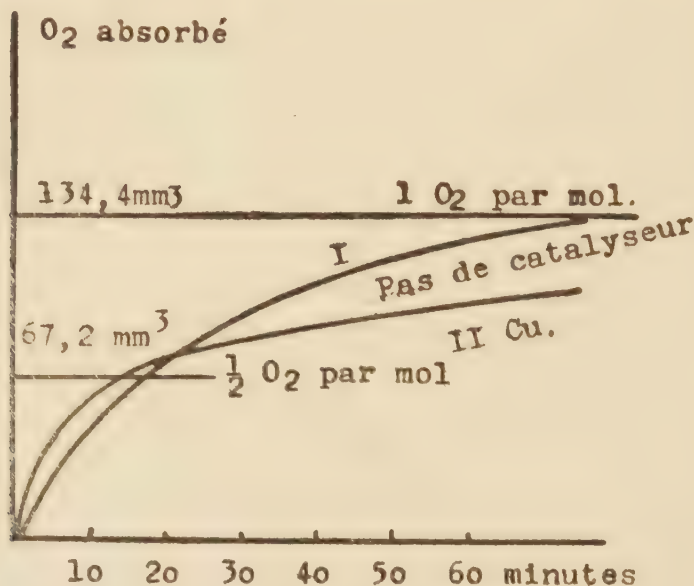


Fig. 16. -- Autoxydation du pyrocatechol avec et sans cuivre.

Pour étudier l'action du cuivre sur cette réaction d'oxydation, on a ajouté au milieu, dans une autre expérience, 0,2 cc. d'une solution de sulfate de cuivre, apportant 80 γ de Cu. Les conditions de l'expérience sont identiques à celles de la précédente.

La courbe représentant l'absorption de l'oxygène a été tracée en II sur le même graphique.

La réaction d'oxydation est, à l'origine, très accélérée par le cuivre : la vitesse initiale est plus que doublée. Cette vitesse décroît d'ailleurs très vite avec le temps. En effet, le temps nécessaire à la fixation d' $\frac{1}{2}$ molécule d'oxygène par molécule de pyro-

catéchol est de 15 minutes contre 17 minutes, en l'absence de cuivre volontairement ajouté. Au bout de 20 minutes les volumes d'oxygène absorbé sont identiques avec et sans cuivre. Au-dessus de 20 minutes, il y a inversion des résultats et le volume d'oxygène absorbé est inférieur à celui du témoin sans cuivre.

Si l'on voulait caractériser grossièrement le phénomène on pourrait dire que *le cuivre accélère l'oxydation du pyrocatechol tant que l'oxygène fixé reste inférieur à $\frac{1}{2}$ molécule d'oxygène par molécule de substrat et qu'il inhibe ensuite cette oxydation.*

Si l'on envisage uniquement les vitesses d'oxydation, on constate qu'en présence comme en absence de cuivre, la vitesse décroît depuis l'origine. D'abord très supérieure à celle du témoin, la vitesse de la réaction catalysée par le cuivre, est ramenée à la valeur de celle-ci lorsque la fixation d'oxygène atteint environ $\frac{1}{4}$ molécule d'oxygène par molécule de pyrocatechol ; elle continue ensuite à décroître plus rapidement que celle du témoin. Au bout de 20 minutes les quantités d'O₂ fixé sont identiques et la réaction « catalysée » par le cuivre se poursuit avec une vitesse sensiblement restreinte.

Catalyse positive, puis inhibition de l'oxydation, telle apparaît donc l'action du cuivre sur l'autoxydation du pyrocatechol dans le tampon boraté de pH 8,5.

Il était intéressant d'étudier également l'autoxydation du pyrocatechol en solution tamponnée aux phosphates, de pH suffisamment bas pour que l'absorption d'oxygène soit, en l'absence de catalyseur, extrêmement faible.

L'expérience a été faite dans les mêmes conditions que précédemment (2 cc. de tampon aux phosphates pH 7,3 ; 0,3 cc. = 0,6 mgr. de pyrocatechol et 0,3 cc. d'eau) ; température : 27°2.

Au bout de 80 minutes le volume d'oxygène absorbé est tellement petit qu'il n'a pu être déterminé ; l'oxydation est pratiquement nulle.

Par contre, si l'on adjoint au milieu 80 γ de cuivre (sous forme de SO₄Cu), l'absorption d'oxygène devient appréciable dès la seconde minute (première lecture). Portés sur un graphique, les points représentant l'absorption en fonction du temps, s'inscrivent sur une courbe, très tendue, qui présente cependant une nette concavité vers l'axe des abscisses. Cette courbe tend vers une parallèle à cet axe correspondant, en gros, à la fixation d' $\frac{1}{4}$ molécule d'oxygène par molécule de pyrocatechol.

Le cuivre a donc, dans ces conditions, un effet catalytique positif sur l'autoxydation du pyrocatechol, en ce sens qu'il permet un départ de la fixation d'oxygène, mais cette fixation se ralentit assez tôt et le pyrocatechol ne parvient même pas à fixer $\frac{1}{2}$ molécule d'O₂ par molécule de diphénol.

Nous trouvons ici la preuve que les molécules fixant l'oxygène atmosphérique ne sont pas « toutes » les molécules du diphénol mais seulement une partie de celles-ci. Ces molécules devenues autoxydables sont vraisemblablement celles qui ont contracté avec le cuivre une liaison chimique (combinaison ou complexe).

Lorsque le cuivre est introduit dans la solution, il se partage entre l'ion acide du sel qu'on utilise (les ions PO₄ ou les ions borate) et les molécules ionisées du pyrocatechol. De l'équilibre ainsi réalisé, il résulte la formation d'un certain nombre de molécules complexes Cu-pyrocatechol (voir la théorie de Szent-Györgyi, plus haut). Ces molécules s'autoxydent rapidement et l'intensité de la fixation d'oxygène est fonction de leur nombre. Cependant le cuivre éprouve une certaine difficulté à quitter la molécule du complexe oxydé pour se lier à une nouvelle molécule de pyrocatechol, c'est pourquoi la vitesse d'oxydation de l'ensemble se ralentit énormément dès que le complexe initial est lui-même oxydé.

*
* *
*

Il est impossible de clore ce chapitre sans rappeler le rôle manifesté par le cuivre comme catalyseur d'oxydo-réduction entre le pyrocatechol et l'adrénaline, dans mes expériences micromanométriques. C'est une fonction semblable à celle qui a été mise en évidence par Straub (1), dans l'oxydo-réduction entre le B. M. et l'acide ascorbique.

(1) STRAUB, *loc. cit.*

III

INHIBITION DE L'AUTOXYDATION

Généralités.

La catalyse positive a pour très proche parente la catalyse négative ou inhibition.

Nous étudierons dans ce chapitre quelques exemples de l'action inhibitrice ou empêchante de certains corps sur l'oxydation de l'adrénaline. Sans doute, estimera-t-on qu'il est utile de faire précéder ces exemples par un *examen des théories qui ont été proposées par différents auteurs pour expliquer ces phénomènes d'inhibition*.

On sait que l'anticatalyse, ou catalyse négative est un phénomène susceptible d'intéresser les types de réactions les plus variées et qu'elle peut être définie comme une action freinatrice exercée sur ces réactions.

Les réactions d'oxydation ont d'ailleurs fourni le plus d'exemples de telles inhibitions.

« On appelle « antioxygènes » les corps qui ont la propriété, « lorsqu'on les ajoute à des matières spontanément oxydables à « l'air, d'empêcher la fixation de l'oxygène *libre*, communément « appelée autoxydation ».

« Ces corps agissent par catalyse négative en ralentissant la « vitesse de réaction. Il est essentiel de bien distinguer leur « mode d'action de tout autre effet protecteur, en particulier de « tout procédé revenant à éviter le contact de la matière oxydable « avec l'oxygène, par exemple en séparant les deux matières par « une couche imperméable (vernis), ou bien encore en raréfiant « l'oxygène autour du corps oxydable, par dilution ou absorption. Le terme d'antioxygène doit être réservé aux agents protecteurs qui agissent par catalyse négative, en diminuant l'ac-

« tivité de l'oxygène, sans l'écarter ou le raréfier » (DUFRAISSE)(1).

Il ne sera pas fait ici d'historique ni d'exposé général concernant la catalyse antioxygène; c'est là, en effet, une question bien connue au pays de MOUREU et DUFRAISSE. Un tel exposé ne pourrait d'ailleurs se trouver que très inférieur à l'article magistral de CH. DUFRAISSE, déjà cité.

On citera néanmoins ces considérations terminologiques de CH. DUFRAISSE : « Pour désigner les ralentisseurs de l'action de l'oxygène, trois noms principaux ont été successivement proposés. Ce sont par ordre de dates : « inhibiteurs » (2) « antioxydants » (3), « antioxygènes » (4).

« Le terme *antioxydants* est impropre et inexact, parce que « les antioxygènes n'ont aucune action retardatrice sur les oxydants, acide chromique, permanganate, etc... Comme par ailleurs il n'a pas été le premier proposé, il n'a aucune raison « d'être utilisé et doit être écarté.

« Le terme *inhibiteurs*, qui aurait le bénéfice de la priorité, a « le défaut d'être trop vague, puisqu'il s'adresse à tout ce qui « peut être cause d'une entrave quelconque, aussi bien dans un « phénomène physique ou chimique que dans l'autoxydation. Il « est donc préférable de le laisser à son acception générale « habituelle.

« Seul le terme *antioxygènes*, précis et limitatif, évite tout « inconvénient; en conséquence, il doit être seul usité ».

A notre avis, la plus extrême prudence s'impose lorsqu'on est mis en présence d'un nouveau *retardateur* d'oxydation. Il sera bon, pour ne pas préjuger de l'intimité du phénomène de ne le désigner que par le terme d'*inhibition*. En effet, l'action *retardatrice* pourrait être imputable, par exemple, à l'immobilisation ou à l'élimination d'un catalyseur positif. Elle pourrait être, par exemple, causée par l'inactivation des molécules autoxydables, et le corps inhibiteur constituerait alors un inhibiteur des affinités chimiques du substrat, dont l'autoxydabilité ne serait qu'un cas particulier.

Quand on parle de phénomène antioxygène on évoque in-

(1) CH. DUFRAISSE, Catalyse d'oxydation : anti-oxygènes et pro-oxygènes, in Grignard, *Traité de Chimie organique*, t. II, fasc. II, p. 1184.

(2) S. W. YOUNG, *J. Am. chem. soc.*, 1901, 23, 119.

(3) A. L. LUMIÈRE et A. SEYEWETZ, *Bull. Soc. Chim.*, 1905, 33 (3), 444.

(4) CH. MOUREU et CH. DUFRAISSE. *Rev. Scient.*, 1922, 4, 1920.

consciemment un *mécanisme* qui est celui de MOUREU et DUFRAISSE, ou plus exactement un *schéma*.

Ce schéma implique un rôle prépondérant attribué aux peroxydes.

La dénomination *inhibiteur* laisse la porte ouverte à tous les mécanismes : nous la choisirons dans les exemples ultérieurs en raison même de son imprécision et parce qu'elle sollicitera des recherches explicatives.

La théorie de l'action antioxygène établie par MOUREU et DUFRAISSE repose entièrement sur l'existence de peroxydes intermédiaires. Il ne faut pourtant pas perdre de vue toute une classe de phénomènes d'oxydation, celle qui concerne les corps qui s'autoxydent par un processus de déshydrogénation.

Pour DUFRAISSE (1), aucune des théories (de l'action antioxygène) ne peut être considérée comme donnant l'image exacte du phénomène antioxygène. «... L'autoxydation est, en réalité, une réaction fort compliquée : c'est probablement pourquoi elle est si facilement dérangée et entravée par une cause minuscule, la présence d'une trace d'antioxygène ».

« A n'en pas douter, l'effet empêchant n'est pas d'une espèce unique...

Il est donc raisonnable de penser qu'il faudra plusieurs théories antioxygènes et que l'on trouvera utilement à glaner dans chacune de celles qui ont déjà vu le jour ».

Les principales sont résumées par DUFRAISSE qui les classe ainsi :

1^o Théories dans lesquelles on attribue au corps empêchant un rôle passif.

a) *Le vernis*. — L'inhibiteur s'interposerait à la façon d'un vernis qui s'autoxyde et les surfaces auxquelles on attribue un rôle actif.

b) *L'écran*. — « L'autoxydation ou la combustion étant amorcée en un point, se propagerait à l'entour par transfert de l'énergie dégagée, laquelle activerait de proche en proche les molécules oxydables et les mettrait ainsi en état de réceptivité pour l'oxygène... L'antioxygène agirait à la manière d'un écran qui arrêterait l'énergie transmise, ou sur lequel les chaînes viendraient buter et se briser ».

(1) DUFRAISSE, *loc. cit.*

Ces théories ont en réalité l'inconvénient d'apparaître comme des explications purement verbales.

2^o Théories dans lesquelles on attribue à l'inhibiteur un rôle actif.

a) *L'empoisonnement*. — Théorie très imprécise, et ne s'appliquant guère qu'aux oxydations déterminées par catalyse hétérogène.

b) La *neutralisation* ou immobilisation d'un catalyseur positif. L'inhibiteur se combinant ou formant un complexe avec le catalyseur le mettrait hors d'état d'agir. Cette théorie a été surtout défendue à l'occasion des oxydations pouvant être catalysées par Cu ou Fe. Si l'on admet que le catalyseur est un peroxyde formé aux dépens du substrat (autocatalyse), ainsi que DUPONT, LÉVY et ALLARD (1) l'ont établi dans le cas de l'acide abiétique, l'antioxygène se lierait avec ce peroxyde et le « paralyserait ».

c) La *désactivation*, ou inactivation du substrat. « Tout le monde est d'accord pour penser, dit DUFRAISSE que l'accomplissement d'une réaction quelconque implique la nécessité, pour les molécules qui y prennent part, de passer préalablement par un état activé ». On a donc pensé que l'inhibiteur inactive ces molécules par un procédé quelconque. La théorie de MOUREU et DUFRAISSE, se ramène à une telle désactivation.

« Le même principe a inspiré la théorie bien connue de Jean PERRIN sur la *désactivation induite des substances* ».

Il faut d'ailleurs souligner que Francis PERRIN a montré (2) que les corps généralement antioxygènes ont le pouvoir d'éteindre la fluorescence, fait confirmé par de nombreux auteurs, en particulier par OUELLET (3) élève de BAUR.

Nous aurons l'occasion, plus loin, de discuter, à propos de l'adrénaline, ces théories de l'inactivation du substrat et de l'immobilisation des catalyseurs.

Théorie de Moureu et Dufraisse.

Pour MOUREU et DUFRAISSE, l'action antioxygène aboutit à une *inactivation* du substrat autoxydable, mais cette inactivation

(1) *Loc. cit.*

(2) F. PERRIN, *C. R.*, 1927, 184, 1121.

(3) C. OUELLET, *Canadian Chem. Metallurgist*, 1932, 16, 168.

n'est pas directe, elle est la conséquence de la formation transitoire d'un peroxyde aux dépens de la molécule activée, suivie du retour à la forme initiale inactivée.

La théorie se fonde sur diverses considérations : « le pouvoir
« antioxygène doit s'exercer par voie chimique. Il semble lié à
« une certaine affinité du catalyseur pour l'oxygène commune
« aux corps les plus variés, quand ils sont soumis à un potentiel
« d'oxydation assez élevé, comme c'est le cas en présence des
« peroxydes d'autoxydation. Mais l'oxydation du catalyseur ne
« peut être que transitoire, sinon, les longues durées du fonc-
« tionnement inhibiteur ne s'expliqueraient pas ». La théorie
s'inspire enfin de la parenté des catalyses inverses.

Sous sa première forme, la théorie qui s'inspire de la réduction mutuelle des *peroxydes antagonistes* peut être schématisée de la façon suivante :

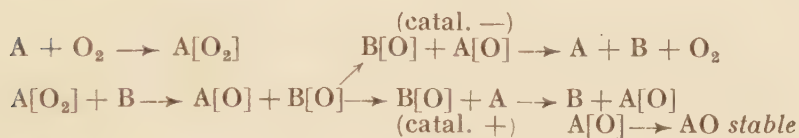
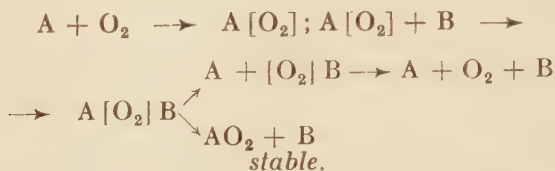


schéma dans lequel A représente le corps autoxydable, B, l'inhibiteur, O l'oxygène et [O] l'oxygène *actif* ou doué de propriétés oxydantes.

Cette théorie a été controversée, on lui a reproché d'être en contradiction avec le deuxième principe de la thermo-dynamique.

La deuxième forme donnée à la théorie de MOUREU et DUFRAISSE esquivé « une difficulté qu'il est préférable d'éviter : le partage de la molécule d'oxygène ». Il y aurait plutôt union du peroxyde primaire $A[O_2]$, et de l'antioxygène B, en un complexe $A[O_2]B$, où B disputerait à la molécule A la possession de O_2 . Il en résulterait pour A un accroissement de sa tendance à quitter O_2 en se désactivant. Le nouveau peroxyde $[O_2]B$, se dissocierait à son tour, soit à cause de l'insuffisante affinité de B pour O_2 , soit parce que l'oxygène n'est pas en posture favorable sur B pour pousser plus loin la combinaison, comme il arrive, par exemple, aux oxydes dissociables, $R[O_2]$, d'hydrocarbures du type rubène, corps pourtant essentiellement oxydables. Le premier cas serait celui d'antioxygènes peu oxydables comme les phosphates ; le second serait celui des nombreux antioxygènes oxydables ».

Et DUFRAISSE ajoute : « Il va sans dire que le complexe $A[O_2B]$, suivant les circonstances, pourra évoluer aussi vers les termes oxydés, stables AO_2 ; et si, éventualité vraisemblable, l'allure en est accélérée, ce sera la catalyse positive. On a alors le schéma suivant :



A la vérité il ne s'agit là, effectivement, que d'un schéma descriptif.

Théorie de Dupont.

Dans la théorie de DUPONT, l'antioxygène B peut « détruire ou réduire l'action » d'un catalyseur $A(O)$ constitué par un oxyde de A « soit en s'associant à lui sous forme de complexe ou de combinaison, soit en provoquant sa transformation en une forme stable, non autoxydable spontanément, soit en détruisant le peroxyde $AO(O_2)$ au fur et à mesure qu'il se forme pour donner un oxyde inactif ».

« On comprend... pourquoi cette action antioxygène peut être obtenue avec une très faible proportion de corps puisque les molécules antioxygènes n'ont toujours à agir que sur un nombre très faible de molécules actives $A(O)$, nombre qui ne peut s'accroître par le fait même que l'oxydation est empêchée ».

DUPONT et ses collaborateurs ont montré (2) qu'au cours de l'autoxydation de l'acide abiétique la proportion de l'autocatalyseur $A(O)$ croît comme la quantité d'oxygène absorbée. Une première vérification de la théorie réside dans le fait que la quantité d'hydroquinone nécessaire pour arrêter l'oxydation est d'autant plus forte que l'oxydation est plus avancée. De plus, si l'hypothèse est bien exacte « l'antioxygène doit agir de la même manière sur un catalyseur d'oxydation de la même famille que AO ».

L'abiétate de cobalt provoque une oxydation très rapide de l'acide abiétique. L'allure du phénomène est celle d'une autoca-

(1) DUPONT et ALLARD, *Bull. Soc. Chim.*, 1930, 47, 1216.

(2) *Bull. Soc. Chim.*, 1930, 47, 61.

lyse, « c'est donc un oxyde intermédiaire qui joue ici le rôle de catalyseur réel ».

Or, avec 1 % de *Co*, sous forme d'abiétate, il suffit de 1 ‰ d'hydroquinone, ajoutée au début, pour arrêter toute oxydation.

Si on laisse, au contraire, l'oxydation atteindre sa vitesse maxima avant d'ajouter l'hydroquinone, il faut environ 1,5 % d'hydroquinone pour arrêter l'oxydation.

Si la proportion d'abiétate de cobalt est réduite de moitié, la proportion d'hydroquinone à utiliser pour aboutir au même résultat est également réduite de moitié.

Ces faits constituent la seconde vérification de la théorie de DUPONT et ALLARD.

* * *

On peut caractériser la théorie de MOUREU et DUFRAISSE en disant qu'elle repose sur l'inactivation des molécules activées du substrat autoxydable. Quant à l'inactivation, elle résulterait de la formation du peroxyde et de la décomposition de celui-ci.

Théorie de Baur.

Une telle inactivation peut être imaginée sans qu'il soit nécessaire de mettre en cause des composés intermédiaires. Emil BAUR (1) a donné une intéressante critique des théories de l'anticatalyse, à laquelle nous emprunterons l'argumentation suivante.

Dans un système hétérogène l'anticatalyse ne présente aucune difficulté, elle s'explique par des phénomènes d'adsorption. En milieu homogène l'explication est plus difficile. Dans ce cas le problème a connu des solutions partielles consistant à admettre l'élimination de catalyseurs positifs, soit par formation de complexes, soit par rupture de chaînes. Pour l'auteur, le domaine de l'anticatalyse est devenu beaucoup trop vaste pour que ces solutions soient suffisantes. En dehors des cas où elles s'appliquent avec évidence, il reste une grande quantité d'anticatalyses inexpliquées.

L'anticatalyse ne se limitant pas aux oxydations, BAUR rejette le terme *antioxygène* et adopte ceux d'*anticatalyseur*,

(1) E. BAUR, *Z. f. physik. Chem.*, Abt B, 1938, 41, 179-82.

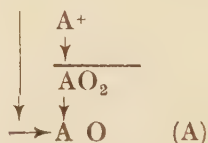
d'inhibiteur et de désensibilisateur, qui sont synonymes. Ce qui montre bien que, pour lui, le point d'attaque de l'inhibiteur est la molécule activée du substrat.

L'auteur remarque d'ailleurs que MOUREU et DUFRAISSE ont, avec raison, insisté sur le fait que toute théorie générale de l'anticatalyse doit impliquer une action sur le substrat, en particulier sur les molécules actives de celui-ci qui sont en état d'équilibre avec les molécules inactives :



où e représente l'énergie d'activation.

Si B désigne l'inhibiteur, le mécanisme (d'inhibition) de MOUREU et DUFRAISSE devrait être représenté par le schéma énergétique



Dans le circuit latéral qui conduit A à un produit d'oxydation stable AO il y a consommation en sens unique de A^+ et chute au niveau de A , qui se fait en deux étapes : la première correspond au peroxyde particulièrement instable AO_2 , auquel s'attaque l'inhibiteur B , et qui conduit au deuxième degré de réaction AO^+ et BO^+ . AO^+ et BO^+ sont de même deux oxydes instables qui se détruisent mutuellement en libérant les substances à partir desquelles s'est faite la réaction, le substrat en particulier sous la forme A . Le substrat subit donc une réaction que l'on peut figurer ainsi



Le circuit latéral diminue la concentration de A^+ et, par là, diminue la vitesse de la réaction d'oxydation. Ce résultat n'est atteint que si le circuit latéral ne fonctionne qu'en sens unique. Il est dès lors en contradiction avec le principe de réversibilité, donc avec le deuxième postulat.

H. S. TAYLOR (1) a élargi le schéma de MOUREU et DUFRAISSE en le rendant indépendant des phénomènes d'oxydation : l'inhi-

(1) H. S. TAYLOR, *J. Phys. chem.*, 1924, 28, 145.

biteur est dès lors un simple catalyseur en sens unique, qui donne avec la molécule activée A^+ un produit intermédiaire instable.

Le circuit latéral fonctionnant encore en sens unique, la contradiction avec la thermodynamique persiste.

BAUR estime que l'ancienne théorie de TITOFF, qui consiste en l'immobilisation d'un catalyseur positif par formation de complexe est affectée de la même faiblesse. Si les inhibiteurs sont de types très divers et si les substrats sont également de nature variée on est en effet conduit à penser que les composés intermédiaires sont inventés pour les besoins de la cause.

L'auteur est d'avis que la notion originale de MOUREU et DUFRAISSE, suivant laquelle l'action anticatalytique dépend d'un circuit latéral à sens unique doit être maintenue.

Il cherche une explication à l'existence de ce circuit, qui ne fasse pas intervenir de liaison chimique.

Le schéma qu'il propose est emprunté au phénomène de la « désensibilisation » photochimique (1) ; des molécules activées par absorption de lumière sont ramenées à leur forme inactive à la suite d'une intervention chimique. Or, il appert que ce sont les mêmes substances qui *inhibent* et qui *désensibilisent*. Et si l'on admet que l'état des molécules actives de la cinétique d'obscurité est identique à celui des molécules activées par la lumière, il est évident qu'on peut identifier les désensibilisateurs aux inhibiteurs (2).

Il est nécessaire d'introduire ici une remarque qui risque de restreindre la portée de ce raisonnement. Revenons en effet aux faits et considérons par exemple l'autoxydation du sulfite. La lumière active cette autoxydation (BECKSTRÖM) (3). L'absorption d'un quantum d'énergie peut amener l'oxydation de 10 à 50.000 molécules de sulfite. Or, un quantum ne peut activer qu'une molécule. C'est pourquoi, il faut imaginer un mécanisme compliqué (HABER) (4) comportant une longue chaîne. Le fonctionnement des inhibiteurs est expliqué par une réaction au cours de laquelle le radical est détruit.

Cependant on sait que le fer et le cuivre catalysent l'autoxyda-

(1) E. BAUR, *Elektrochem.*, 34, 1928, 595 ; *Helv. chim. Acta*, 12, 1929, 793.

(2) E. BAUR, *Z. Physik-chem.*, 16, 465, 1932.

(3) H. L. BECKSTRÖM, *Am. chem. J.*, 49, 1927, 1560.

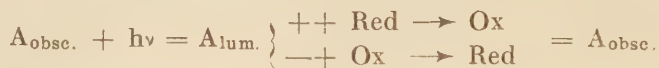
(4) HABER, *Naturwiss.*, 19, 450, 1931.

tion du sulfite. SZENT-GYÖRGYI fait remarquer que, d'après GERENDAS, l'action de la lumière peut donner naissance, aux dépens du sulfite, à des substances, comme le *dithionate*, qui catalysent l'autoxydation. D'autres substances, comme le thio-sulfate, sont susceptibles d'entrer dans le complexe (Cu-sulfite) pour donner un nouveau complexe beaucoup plus oxydable. *L'activation par la lumière pourrait donc se ramener, au moins en partie, à la formation de telles substances.*

Par voie de conséquence, l'action d'un inhibiteur considéré comme *désensibilisant*, dans l'hypothèse de l'inactivation de la molécule ayant absorbé un quantum d'énergie, pourrait aussi bien s'expliquer par une liaison avec le complexe autoxydant (1). M. GERENDAS a trouvé en effet que la plupart des substances ajoutées au sulfite dont l'oxydation est catalysée par Fe ou Cu, inhibent l'oxydation du substrat.

Mais retournons à la théorie de BAUR. Cet auteur a montré, avec différents collaborateurs (OBRECHT, OUELLET), que *les désensibilisateurs sont, en principe, toutes les substances susceptibles de donner lieu à un équilibre red-ox.*

La réaction circulaire doit être comprise comme une « *électrolyse alternante* » qui se joue entre les couches extérieure négative, et intérieure, positive de la molécule intéressée, suivant le schéma :



L'anticatalyse consisterait donc en une oscillation entre deux degrés de valence.

On est à nouveau en présence d'un *circuit latéral à sens unique*. Si l'on s'est débarrassé des « *menottes* » des composés intermédiaires, il reste toujours le déplacement de « l'équilibre d'obscurité » et la contradiction demeure avec la thermodynamique, comme le fait remarquer BAUR (2).

Ce qui fait la force de persuasion de la théorie de BAUR c'est qu'il a pu montrer avec ses collaborateurs que des ions métalliques, capables d'osciller entre plusieurs degrés de valences, peuvent se conduire comme *inhibiteurs* de réactions d'autoxydation vis-à-vis de substrats, tels que le sulfite et l'adrénaline,

(1) Cf. la théorie de SZENT-GYÖRGYI exposée au précédent chapitre.

(2) Pour la discussion voir BAUR, *Z. f. Phys. chem.*, Abt B, 41, 179-182, 1938.

substances pour lesquelles l'action catalytique positive des mêmes métaux était bien connue et seule envisagée (1).

Nous verrons plus loin, à propos de l'adrénaline, d'autres exemples de telles inhibitions par des substances red-ox, empruntés aux travaux de l'Ecole de BAUR.

. * .

Discussion générale et théorie de Szent-Györgyi.

Les théories diffèrent suivant les préoccupations des chercheurs et suivant la classe de phénomènes qu'ils ont envisagée.

Pour MOUREU et DUFRAISSE la formation du peroxyde primaire caractérise l'autoxydation et ces savants donnent un caractère de généralité à leur schéma du mécanisme antioxygène qui est essentiellement basé sur l'existence des oxydes intermédiaires.

Pour BAUR les phénomènes de « désensibilisation » ou d'inactivation chimique des molécules activées par la lumière, peuvent donner un modèle de l'inhibition d'oxydation, par un mécanisme identique : celui de la désactivation par oscillation d'un système red-ox.

Pour SZENT-GYÖRGYI enfin, qui est un biochimiste, les phénomènes d'oxydation déshydrogénante présentent naturellement le plus d'intérêt. Or, ces phénomènes sont catalysés par des enzymes que les recherches les plus récentes ont montré constitués par un métal (Fe, Cu) lié à un substrat organique. Ces métaux sont ceux qui catalysent *in vitro* les mêmes réactions d'autoxydation et leur activité catalytique est très fortement accrue par leur entrée dans un complexe organique.

Nous avons déjà vu comment SZENT-GYÖRGYI explique le rôle catalytique de ces métaux, par formation d'un complexe avec le substrat, complexe qui s'incorpore une molécule d'oxygène et à l'intérieur duquel l'atome métallique transporte des électrons entre l'oxygène et le substrat.

Nous avons également déjà vu comment s'explique, dans une telle conception, l'action d'un inhibiteur. La molécule d'inhibiteur se coordonne avec le complexe autoxydable pour donner un

(1) Ces actions inhibitrices s'expliquent fort bien dans la théorie de SZENT-GYÖRGYI par la formation de complexes inactifs.

nouveau complexe mixte qui est moins oxydable que le premier.

D'inhibiteur, le corps, introduit dans le système à d'autres concentrations, peut devenir activateur, s'il donne un complexe mixte plus autoxydable que le premier. Nous retrouvons ainsi un des caractères fondamentaux de ces phénomènes : la parenté des catalyses inverses. Notons d'ailleurs, que l'inhibiteur peut exercer son effet de trois façons différentes : soit en prenant la place de l'oxygène à l'intérieur du complexe, soit en entrant en concurrence avec le substrat vis-à-vis du métal dont il déplace une partie, soit en formant avec le substrat et le métal un complexe mixte.

Remarquons en passant que cette théorie est parfaitement compatible avec la réversibilité de l'inhibition par le cyanure dans les cellules vivantes, phénomène qu'on opposait depuis les recherches de WARBURG à l'irréversibilité des inhibitions analogues réalisées *in vitro* par la même substance.

Votlà une théorie extrêmement séduisante de l'inhibition des autoxydations, qui s'appuie constamment sur des faits et sur des expériences extrêmement élégantes.

Elle est d'ailleurs limitée, dans l'esprit de son auteur, au cas de l'*autoxydation déshydrogénante* (Celle des composés non saturés, de l'hyposulfite, des aldéhydes, également susceptibles d'être catalysées par des métaux, est vraisemblablement différente).

La théorie de SZENT-GYÖRGYI pose à nouveau le problème de savoir si les corps dont l'autoxydation est catalysée par les métaux lourds (Fe, Cu) ont besoin de ces métaux pour subir l'autoxydation, ou si, au contraire, ils sont par eux-mêmes autoxydables en absence de toute trace d'ion métallique. C'est là, une question très délicate et il ne semble pas qu'elle comporte une réponse univoque, décisive.

L'examen de tous les cas particuliers nous entraînerait à des développements considérables, d'ailleurs inutiles. On trouvera une bonne étude de cette question dans le traité d'EULER, sous la plume de FRANKE.

Nous nous bornerons à quelques cas d'oxydation déshydrogénante qui, seuls, nous intéressent ici :

1^o Parmi les composés sulfhydrilés, la cystéine a fait l'objet de nombreuses recherches. On sait que cette substance s'autoxyde avec une certaine vitesse. Cette vitesse augmente par addition de Fe ou de Cu ; elle diminue à la suite de purifications qui éli-

minent ces métaux, ou à la suite d'addition de cyanure (WARBURG et SUKUMA (1); SUKUMA (2); ELLIOTT (3), HARRISON (4), etc...). Mais ni WARBURG et SUKUMA, ni HARRISON n'ont pu obtenir de cystéine insensible à l'action de l'oxygène par addition de cyanure. En outre, GERWE (4) a constaté que la *vitesse d'autoxydation de la cystéine la plus pure est environ 50 fois plus grande que si elle correspondait aux traces de fer présentes.*

Quant à savoir si cette oxydation « restante » peut être due à des traces de Cu (KREBS (6); ELVEHJEM (7)), cela ne semblait pas probable à FRANKE (*loc. cit.*), car GERWE n'en a pu obtenir l'inhibition indiscutable par CNH à la forte concentration de $M/100$.

Si nous ne savions maintenant que la non inhibition par CNH ne peut plus être considérée comme la preuve de la non catalyse par métal lourd, nous concluons donc à la possibilité d'une autoxydation sans catalyseur. La question reste pourtant posée.

2° L'autoxydation du sulfite a fait également couler beaucoup d'encre. Pour BIGELOW (8), la « réaction normale » dépend de la bonne volonté d'influences indéterminables. TITOFF (9), portant son attention sur la pureté de l'eau distillée, ramène la vitesse d'autoxydation du sulfite à moins de 1 % de sa valeur primitive. Il suppose que la « catalyse négative » décrite par BIGELOW provient de l'exclusion d'un catalyseur positif. Ce catalyseur positif serait Cu; cet ion est en effet plus de 1000 fois plus actif que les autres ions métalliques et son action est déjà sen-

sible à la concentration de $\frac{M}{10^8}$. Il est intéressant de noter que la conclusion de TITOFF appelle déjà celles de WARBURG et surtout de SZENT-GYÖRGYI, lorsqu'il écrit (10): « que la réaction entre le « sulfite de soude et l'oxygène, en l'absence complète de catalyseurs se fait avec une lenteur non mesurable et que la vitesse « de réaction que l'on mesure dans chaque cas correspond à la

(1) WARBURG et SUKUMA, *Pflüg. Arch.*, 200, 203, 1923.

(2) SUKUMA, *Biochem. Z.*, 142, 68, 1923.

(3) ELLIOTT, *Biochem. J.*, 24, 310, 1930.

(4) HARRISON, *Biochem. J.*, 18, 1009, 1924.

(5) GERWE, *J. Biol. Chem.*, 91, 57; 92, 399; 525, 1931.

(6) KREBS, *Naturw.*, 18, 736, 1930.

(7) ELVEHJEM, *Science*, 74, 568, 1931.

(8) BIGELOW, *Physik. Chem.*, 26, 493, 1898.

(9) TITOFF, *Physik. Chem.*, 45, 641, 1903.

(10) TITOFF, *loc. cit.*

« présence d'une masse déterminée d'un catalyseur. L'action des
« catalyseurs négatifs ne réside que dans le fait qu'ils forment
« des combinaisons moins dissociées avec les composés actifs
« de Cu (comme le fait par exemple CNK) ou *qu'ils modifient*
d'une façon ou d'une autre ces composés actifs » (1) (voir plus haut
le résumé des travaux de GERENDAS).

3° L'hydroquinone, l'acide dihydroxymaléique, l'acide ascorbique, etc., sont également des corps dont les solutions s'autoxydent à l'air en se déshydrogénant.

WIELAND et FRANKE (2) ont purifié l'hydroquinone par sublimation et recristallisations dans l'eau distillée du quartz. L'autoxydation de la solution de cette hydroquinone dans l'eau est réduite environ au 1/3 de sa valeur initiale. Elle est donc encore importante. Si on rapproche l'accélération réalisée par addition de petites quantités de Fe ou de Cu, des traces de métaux lourds présentes dans le corps purifié, ces traces apparaissent comme hors de proportion avec « l'autoxydation restante ».

Ici encore, CNH M/200 n'inhibe l'autoxydation, ni à pH 5 ni à pH 9 ; mais, à la suite des résultats de SZENT-GYÖRGYI et de ses collaborateurs, ce fait perd toute signification.

L'autoxydation de l'acide dihydroxymaléique a donné lieu à des observations analogues de la part des mêmes auteurs.

4° Le groupement atomique ène-diol, présent dans la molécule d'acide dihydroxymaléique, se retrouve dans celle de l'acide ascorbique, comme dans celles du pyrocatéchol et de l'adrénaline. L'autoxydation de l'acide ascorbique a été maintes fois étudiée. L'examen de toute la littérature scientifique nous éloignerait beaucoup de notre sujet et risquerait de nous entraîner à de longs développements. On sait que le Cu est généralement considéré comme le catalyseur de cette oxydation *in vitro*. Le fer en est également un bon catalyseur.

Or, le fer donne avec l'acide ascorbique, un magnifique complexe violet qui, à l'état réduit, est incolore (3). On sait que c'est l'existence de ce complexe autoxydable qui a mis SZENT-GYÖRGYI sur la voie de sa théorie de l'autoxydation. (L'acide ascorbique, l'acide dihydroxymaléique, le pyrocatéchol, donnent un complexe analogue). Ce complexe est, d'après l'auteur, responsable

(1) C'est nous qui soulignons.

(2) WIELAND et FRANKE, A., 464, 101, 1928.

(3) SZENT-GYÖRGYI, *Hoppe Seyler's*, 225, 168, 1934.

de la catalyse d'autoxydation. Le cuivre, d'après BANGA (1), donne également de tels complexes, lesquels seraient responsables de l'autoxydation des solutions.

GHOSH (2), ajoutant de l'acide cyanhydrique aux solutions d'acide ascorbique, en obtient malgré tout l'oxydation. Il en conclut à une autoxydation de l'acide ascorbique en *absence complète d'ions Cu*. Nous savons maintenant qu'un tel résultat n'autorise pas pareille conclusion (SZENT-GYÖRGYI) ; l'acide cyanhydrique n'« immobilise » pas toujours le cuivre. En outre, il peut subsister des traces de fer. Un travail récent de SCHÜMMER (3) établit les faits suivants :

a) L'autoxydation de l'acide ascorbique apparaît comme une réaction pseudo-monomoléculaire.

b) Cette autoxydation est généralement considérée comme l'effet de traces de métaux lourds. *L'élimination complète de ces métaux dans la solution tampon de phosphate est impossible.*

c) La fumée de tabac, le gaz d'éclairage, même à l'état de traces, inhibent l'autoxydation (HCN et CO).

d) *L'autoxydation ne peut être entièrement bloquée.* Le cuivre ne peut être considéré comme responsable de « l'autoxydation restante », par contre, il est probable qu'elle est due au fer, car le fer, à l'encontre du cuivre, est capable de lever l'inhibition.

Pour l'auteur, l'existence d'une réaction d'autoxydation, non catalysée, en milieu neutre est peu vraisemblable.

D'ailleurs, un autre travail du même auteur (4), montre que la protoporphyrine inhibe l'autoxydation de l'acide ascorbique de la même manière que l'acide cyanhydrique. *L'inhibition a pour cause l'incorporation complexe des traces de Cu de la solution tampon de phosphates à la molécule de porphyrine.* Ce complexe ne catalyse pas l'oxydation de l'acide ascorbique à la lumière, tandis que la protoporphyrine catalyse ce phénomène.

Mais, comme CNH, la protoporphyrine n'inhibe pas complètement l'autoxydation. Or le fer ne peut, dans ces conditions, donner de complexe avec la protoporphyrine et les auteurs voient là un argument de plus pour supposer que le fer est responsable de l'autoxydation restante de l'acide ascorbique.

(1) BANGA, *loc. cit.*

(2) GHOSH, *Biochem. Z.*, 289, 15, 1937.

(3) SCHÜMMER, *Biochem. Z.*, 304, 1, 1940.

(4) SCHREUSS et SCHÜMMER, *Biochem. Z.*, 304, 18, 1940.

En résumé, il y a quelques années, on était conduit à penser que l'autoxydation déshydrogénante pouvait se manifester, dans certains cas, en l'absence de catalyseurs et qu'elle était une propriété intrinsèque de la molécule. Aujourd'hui, les techniques s'affinant, et les interprétations devenant moins aléatoires — surtout après les travaux de SZENT-GYÖRGYI — il reste de moins en moins de place pour la probabilité de telles oxydations non catalysées (1).

L'étude des phénomènes d'oxydation déshydrogénante nous a donc conduits à deux constatations importantes : l'autoxydation des corps qui s'oxydent en perdant de l'hydrogène apparaît de plus en plus comme nécessitant la présence de catalyseurs (ions métalliques) ; l'inhibition de l'autoxydation est en rapport avec la formation de complexes avec des catalyseurs d'autoxydation, l'accélération de l'autoxydation peut être obtenue par action des mêmes substances qui, à d'autres concentrations, donnent naissance à des complexes dans lesquels le métal est activé.

Les inhibiteurs de l'oxydation de l'adrénaline.

On sait depuis longtemps que certaines substances empêchent l'oxydation des solutions d'adrénaline. Ce sont des corps réducteurs, comme les sulfites, ou des substances dont l'action était *a priori* imprévisible comme les acides aminés.

Nous passerons ici en revue un certain nombre de ces substances.

Acides aminés.

ABDERHALDEN et GELLHORN (2) ont montré (1923) que l'addition de plasma ou de sérum sanguins à une solution de l. adrén-

(1) On introduira ici une légère restriction ; celle-ci concerne la réaction des solutions envisagées, et le rôle possible des ions alcalins des sels utilisés comme tampons. On doit penser, en effet, qu'une véritable activation de la molécule autoxydable peut être réalisée par la dissociation ionique (voir chap. I). Dans ces conditions, une « autoxydation restante » ou indépendante de tout catalyseur-métal lourd peut intervenir. Une telle oxydation impliquerait vraisemblablement la formation de peroxydes et serait d'essence tout à fait différente de l'autoxydation par déshydrogénation.

Nous examinerons plus loin la probabilité de tels phénomènes dans l'autoxydation de l'adrénaline.

(2) ABDERHALDEN et GELLHORN, *Pflüg. Arch.*, 1923, 199, 320 et 437 ; 1924, 203, 42.

naline dans le liquide de RINGER protège cette substance contre son oxydation à l'air. 5 cc. de RINGER additionnés de 0,2 cc. de solution d'adrénaline 1/10.000 présentent, au bout de 24 heures, une coloration rouge (celle de l'adrénochrome).

L'addition de 0,19 cc. de plasma à cette solution a suffi pour que, dans le même temps, la solution reste presque incolore.

Cet effet d'inhibition de l'oxydation est vérifié par l'essai sur les organes isolés (cœur de Grenouille, intestin de Cobaye) qui, lorsqu'ils baignent dans un liquide renfermant un peu de plasma répondent à l'adrénaline pendant un temps très prolongé.

Les mêmes auteurs (1) ont ensuite montré qu'une prolongation analogue de la durée d'action de l'adrénaline sur les organes isolés pouvait être obtenue par l'addition au milieu dans lequel baignent ces organes de minimes quantités d'acides aminés. Le glyocolle, l'alanine (1/25.000), la diiodotyrosine (1/50.000), la l. tyrosine (1/50.000) la d. tyrosine (plus active que la l.), (limite d'action 1/200.000), l'histidine (1/50.000), le tryptophane (1/50.000), la proline (1/50.000), présentent cette propriété.

Des faits analogues ont été décrits ensuite par BERGGREN (2) à propos des extraits d'organes (vaisseaux de Bovidés, intestin isolé de Lapin, utérus de Lapine) ; par BRODD (3) pour la créatine et l'arginine (Grenouille, utérus de Lapine) ; par BERGSTRÖM (4)

pour l'acide agaricinique
$$\begin{array}{c} \text{CO}_2\text{HCO}_2\text{H} \\ | \quad | \\ \text{C}_{16}\text{H}_{33} - \text{C} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H} \\ | \quad | \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$$

EKERFORS (5) qui a fait une étude colorimétrique de l'inhibition de l'oxydation des solutions d'adrénaline. D'après MALAFAYA-BAPTISTA (6) l'oxydation de l'adrénaline est « gênée » par les acides aminés $\frac{\text{M}}{10}$: asparagine, glyocolle, alanine, leucine, dans le tampon aux phosphates. Les filtrats de sérum ont la même action.

WILTSHIRE (7) estime que l'inhibition de l'oxydation réalisée

(1) ABDERHALDEN et GELLHORN, *Pflüg. Arch.*, 1924, 206, 154-61.

(2) BERGGREN, *C. R. Soc. biol.*, 1925, 93, 197.

(3) BRODD, *C. R. Soc. biol.*, 1925, 93, 203.

(4) BERGSTRÖM, *C. R. Soc. biol.*, 1925, 93, 1155.

(5) EKERFORS, *C. R. Soc. biol.*, 1925, 93, 1162.

(6) MALAFAYA-BAPTISTA, *Arqu. Pat.*, 1938, 10, 5-77.

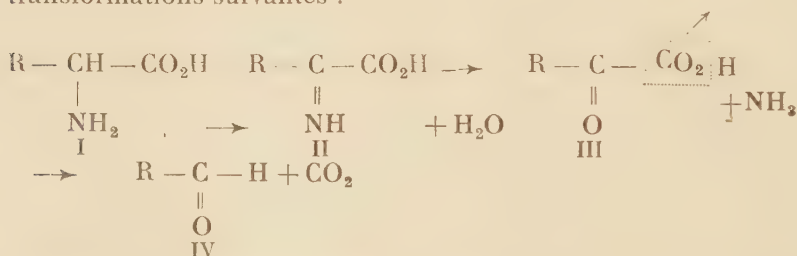
(7) WILTSHIRE, *J. Physiol.*, 72, 88-109, 1931.

par le sérum est due aux acides aminés et *pense que ces acides, se combinant à l'adrénaline, en assurent ainsi la préservation.*

EDELBACHER et KRAUS (1), BLIX (2), KISCH (3), BARRENSCHEEN et DANZER (4), DE MERRIK WELCH (5) ont établi que l'adrénaline a la propriété de réaliser l'oxydation des acides aminés en les désaminant.

La déshydrogénation de la fonction amine est réalisée, soit par la quinone de l'adrénaline, soit par l'adrénochrome qui reconstituent l'adrénochrome réduit ou l'adrénaline elle-même. Dans les deux cas ce phénomène peut aboutir au freinage de l'oxydation de l'adrénaline, soit en déplaçant l'équilibre de l'adrénaline avec sa quinone, phénomène peu vraisemblable en raison de la grande instabilité de cette quinone, soit plutôt en réduisant l'adrénochrome qui, comme nous l'avons vu, se comporte comme catalyseur dans l'autoxydation de l'adrénaline.

Quant aux acides aminés eux-mêmes, ils passent par les transformations suivantes :



aboutissant en définitive à de l'aldéhyde, de l'ammoniaque et du CO_2 . Dans le cas du glycocole BARRENSCHEEN et DANZER ont bloqué l'acide glyoxylique formé en III par la 2-4 dinitro-phénylhydrazine.

Les expériences effectuées dans le tampon de phosphates (pH 6,8 et 7,7) ont montré que, parmi les dérivés pyrocatechiques essayés, c'est l'adrénaline qui réalise cette oxydation avec la plus grande vitesse.

L'inhibition par les acides aminés offre un des rares exemples où le phénomène d'inhibition trouve son explication dans une réaction entre l'inhibiteur et le produit d'oxydation du substrat.

(1) EDELBACHER et KRAUS, *Z. Physiol. chem.*, 178, 239-249, 1928.

(2) BLIX, *Skand. Arch. Physiol.*, 56, 131-172, 1929.

(3) KISCH, *Biochem. Z.*, 236, 380, 1931.

(4) BARRENSCHEEN et DANZER, *Z. physiol. chem.*, 220, 57-60, 1933.

(5) DE MERRIT WELCH, *Amer. J. Physiol.*, 108, 360-72, 1934.

Cette explication apparaît donc très vraisemblable. *Pourtant, on peut en invoquer d'autres.*

OBRECHT (1) qui a fait l'étude manométrique de l'inhibition d'oxydation de l'adrénaline par quelques substances aminées a envisagé deux acides aminés : le glyocolle et la phénylalanine. Alors que les autres substances aminées sont, suivant leur concentration, inhibitrices ou accélératrices, le glyocolle et la phénylalanine sont toujours inhibiteurs ; ce qui, notons-le, s'explique parfaitement par la théorie d'oxydo-réduction qui vient d'être exposée. Mais OBRECHT *ne parle même pas de l'oxydation de ses inhibiteurs* et, pour lui, les acides aminés jouent le rôle d'inhibiteurs, *comme toutes les substances inhibitrices*, en désactivant les molécules actives d'adrénaline par oscillation entre une forme réduite (la fonction amine) et une forme oxydée (la fonction imine).

D'autre part, les acides aminés sont d'assez bons formateurs de complexes métalliques — en particulier avec le cuivre. On sait que BANGA (2) ajoute de l'éthylènediamine à une solution cuivrique et obtient un complexe violet. Lorsqu'elle additionne au milieu une substance susceptible de former un complexe avec Cu, cette substance entre en concurrence avec l'éthylènediamine et la teinte violette rétrograde ; quand la saturation n'est que partielle, la teinte est bleue. BANGA a caractérisé par cette méthode un certain nombre de formateurs de complexes avec le Cu, et indiqué un ordre de grandeur de leur activité à cet égard. Sa méthode s'est trouvée en défaut avec le glyocolle et l'alanine qui donnent eux-mêmes avec le cuivre un *complexe bleu*. *L'essentiel est que ce complexe existe effectivement.*

Une explication de l'inhibition d'oxydation de l'adrénaline par les acides aminés pourrait donc être trouvée dans l'immobilisation du cuivre sous forme de complexe inactif. Certains auteurs ont attribué aux protéines l'action inhibitrice du sérum sur l'oxydation de l'adrénaline (3-4). Des substances réductrices comme le glutathion et l'acide ascorbique peuvent d'ailleurs avoir leur part dans cette inhibition. Il est possible également que les vitamines B₁ et B₂ présentes dans ce milieu modifient également l'oxydation de l'adrénaline.

(1) OBRECHT, *loc. cit.*

(2) BANGA, *loc. cit.*

(3) BONHOMME, *Arc. Int. Physiol.*, 43, 341-50, 1936.

(4) BONHOMME et BACQ, *C. R. Soc. biol.*, 122, 110, 1936.

OBRECHT (1) a fait l'étude d'autres substances possédant le groupement aminé et susceptibles de donner lieu à un équilibre red-ox par le passage de cette fonction à la fonction imine. Les corps étudiés sont le carbonate de guanidine, la synthaline B et la phénylurée.

L'inhibition de l'autoxydation de l'adrénaline est déjà sensible à la guanidine à la concentration de 10^{-6} ; elle se transforme en accélération à la concentration de 10^{-2} . Cette observation est parfaitement conforme aux expériences physiologiques de BURUS et SECKER (2) et à leur interprétation du mode d'action de la guanidine qui n'est pas oxydée « préférentiellement » mais qui « freine » l'oxydation de l'adrénaline.

La synthaline (dodécaméthylènediguanidine), ne donne lieu qu'à des inhibitions dont l'importance est fonction de sa concentration.

Quant à la phénylurée, elle provoque l'inhibition aux faibles concentrations et exerce aux plus fortes un effet catalytique positif.

Deux phénols ont été étudiés par OBRECHT : l'hydroquinone et le métol (p. amidophénol).

Dans le cas de l'hydroquinone, c'est le mélange équimoléculaire quinone-hydroquinone qui est mis en œuvre ; les courbes publiées par l'auteur (3) montrent une très légère inhibition à la concentration $M/10^6$ et une très intense action catalytique aux concentrations de 10^{-4} et 10^{-3} . On a déjà fait l'examen critique de ces résultats dans la seconde partie de ce travail. Rappelons que mes propres expériences (4) mettent en évidence une forte action prooxygène de l'hydroquinone sur l'adrénaline et qu'elles montrent que, dans le système formé par ce mélange, c'est l'adrénaline qui s'oxyde avec une vitesse accrue par la présence de l'hydroquinone.

Le potentiel d'oxydo-réduction normal de l'hydroquinone est nettement inférieur à celui de l'adrénaline, l'hydroquinone devrait donc réduire le système composé par l'adrénaline et sa forme oxydée. Or, en présence de l'air, c'est l'inverse que l'on constate, l'hydroquinone catalyse l'autoxydation de l'adrénaline.

On rappellera ici mes propres expériences, où l'on voit le

(1) OBRECHT, *loc. cit.*

(2) BURUS et SECKER, *J. Physiology*, 88, Proc. 2-3, 1936.

(3) *Loc. cit.*, p. 37.

(4) Chap. II.

pyrocatechol, dont le potentiel normal d'oxydo-réduction est inférieur à celui de l'adrénaline, se comporter également, en présence de l'air, comme un oxydant pour l'adrénaline. On rappellera surtout les expériences de KENDALL (1) et de BLIX (2) suivant lesquelles le 2-6 dibromophénol-indophénol et le 2-6 dichlorophénol-indophénol, dont les potentiels caractéristiques sont tous deux très inférieurs à celui de l'adrénaline sont réduits par l'adrénaline à des pH voisins de 7. BALL et CHEN (3) ont développé l'explication de ce phénomène paradoxal. L'indophénol et l'adrénaline réagissent initialement de telle manière qu'environ 0,1 % de l'indicateur est réduit et que la quantité équivalente d'adrénaline est oxydée. *Cependant, il résulte de l'extrême instabilité de la quinone de l'adrénaline que, pour maintenir le niveau énergétique, une nouvelle quantité équivalente d'adrénaline doit être oxydée. Cette suite de phénomènes aboutit, en définitive, à l'oxydation de toute l'adrénaline initialement présente.*

Il est clair que la même interprétation des choses est valable dans le cas des mélanges hydroquinone-adrénaline et pyrocatechol-adrénaline et que, par conséquent, les faits que nous avons observés et ceux qui ont été décrits par OBRECHT ne sont pas incompatibles avec les valeurs des potentiels d'oxydo-réduction normaux des substances en présence.

Le métol, étudié par OBRECHT, a, aux très faibles concentrations une action inhibitrice, qui se transforme déjà en action positive à 10^{-4} , soit à une concentration de l'ordre de celle de l'adrénaline ($3,3 \cdot 10^{-4}$). Une substance éolique, l'acide ascorbique a retenu l'attention du même auteur. Plusieurs chercheurs, avant lui, avaient constaté l'action empêchante ou protectrice de cette substance.

ABDERHALDEN (4), avait signalé cette action protectrice en solution dans le tampon aux phosphates.

KREITMAIR (5), la même année, montrait que l'acide ascorbique augmente les effets physiologiques de l'adrénaline. En 1934 également DE MERRIT WELCH (6) estimait que l'acide ascorbique

(1) KENDALL, *Science*, 67, 382, 1928.

(2) BLIX, *Z. Physiol. Chem.*, 210, 87, 1932.

(3) BALL et CHEN, *loc. cit.*

(4) ABDERHALDEN, *Fermentforsch.*, 14, 367, 1934.

(5) KREITMAIR, *Arch. f. exp. Path.*, 176, 326, 1934.

(6) DE MERRIT WELCH, *loc. cit.*

qui, comme le glutathion, la cystéine et les corps sulfhydrylés, prévient complètement l'oxydation de l'adrénaline, préserve *in vivo* cette hormone en raison de son potentiel d'oxydo réduction plus négatif. PETER HOLTZ (1) montrait d'ailleurs en 1936, que les sucres irradiés aux rayons ultra-violets préservent, comme l'acide ascorbique, les solutions d'adrénaline exposées à l'oxydation par l'air. D'autre part, LUCAS et BONNYCASTLE (2) utilisaient cette action préservatrice de l'acide ascorbique pour éviter l'oxydation spontanée de l'adrénaline dans les bains salins servant à leurs expériences sur les organes isolés. MARIO REISER (3) (1938) montrait enfin, par de belles expériences pratiquées *in vivo*, que l'acide ascorbique permet à une perfusion d'adrénaline de réaliser une élévation constante de la tension artérielle, élévation d'autant plus importante que la masse d'acide ascorbique est plus grande.

Les mesures directes du phénomène d'oxydation sont parfaitement conformes à ces résultats et vérifient leur interprétation. Parmi celles-ci, il convient de citer celles de HEARD et WELCH (4) (1935) qui déterminent par micromanométrie les courbes d'absorption de l'oxygène par les solutions tamponnées d'adrénaline à pH 7,36. Dans un mélange d'acide ascorbique et d'adrénaline soumis à l'autoxydation, l'acide ascorbique s'oxyde et l'adrénaline est *préservée* tant qu'il reste de l'acide ascorbique réduit. Les courbes d'absorption d'oxygène de ces auteurs montrent bien que le mélange d'acide ascorbique (1/200 millimol.) et d'adrénaline (1/200 millimol.) s'oxyde beaucoup plus lentement que l'acide ascorbique seul.

La courbe d'absorption est caractéristique d'un système d'oxydoréduction et semblable à celle du système couplé glutathion-adrénaline.

Les potentiels d'oxydoréduction de l'adrénaline (0^v,388) et de l'acide ascorbique (— 0^v,045), à pH 7 et à 30°, sont d'accord avec l'hypothèse suivant laquelle la quinone, produit d'oxydation primaire de l'adrénaline, est réduite par l'acide ascorbique.

On citera encore les expériences de BLASCHKO, RICHTER et SCHLOSSMANN (5) (1937). Ces auteurs mettent en évidence, en

(1) PETER HOLTZ, *Arch. f. exp. Path.*, 182, 141, 1936.

(2) LUCAS et BONNYCASTLE, *Arch. Int. Pharmac.*, 60, 195-205, 1938.

(3) MARIO REISER, *Arch. f. exp. Path.*, 190, 384, 1938.

(4) HEARD et WELCH, *Biochem. J.*, 29, (1), 998, 1935.

(5) BLASCHKO, RICHTER et SCHLOSSMANN, *J. Physiol.*, 90, 1, 1937.

particulier, que : a) dans le tampon phosphaté de pH 7,3, l'autoxydation de l'adrénaline n'est que très peu inhibée par CNH M/1000 ; et que b) *l'addition d'acide ascorbique inhibe fortement cette autoxydation*. Ces expériences réalisées par micromanométrie ne souffrent aucune critique et ne comportent aucune interprétation différente.

OBRECHT (1) (1938) enfin, opérant aussi par la méthode manométrique retrouve l'inhibition de l'autoxydation de l'adrénaline par l'acide ascorbique (*et jamais d'activation*).

On ne peut rien conclure du fait que l'oxydation de l'adrénaline est insensible au cyanure, cela ne signifie nullement que cette oxydation soit l'œuvre d'un catalyseur, ainsi que nous l'avons vu plus haut. (Dans une de mes expériences, on voit le cyanure de potassium activer l'oxydation de l'adrénaline catalysée par des traces de fer).

Si l'oxydation de l'adrénaline est inhibée par l'acide l. ascorbique, une action réciproque a été également parfaitement démontrée.

YAMAMOTO (2) a montré que l'adrénaline empêche l'oxydation à l'air des solutions d'acide ascorbique. Dans ses expériences on mesure par la méthode micromanométrique de WARBURG les volumes d'oxygène absorbés par des solutions d'acide ascorbique dans le tampon de phosphates, pH 7,38, auxquelles sont ajoutées diverses quantités d'adrénaline. On arrête l'expérience au bout de 45 m. d'agitation à 18° C et l'on détermine alors les quantités d'acide ascorbique restantes par dosage au 2-6 dichlorophénol-indophénol après stabilisation par l'acide métaphosphorique. On détermine aussi les quantités d'adrénaline subsistant en fin d'expérience.

L'adrénaline *gauche* exerce une forte action inhibitrice sur l'autoxydation de l'acide ascorbique. La d, l. adrénaline n'inhibe cette autoxydation que d'une valeur de moitié moindre. L'autoxydation de l'acide ascorbique est freinée par la l. adrénaline, et ce freinage atteint 88 % lorsque la relation moléculaire entre les deux substances est égale à 1/1. Dans le cas de la d, l. adrénaline le pourcentage d'inhibition est maximum (45 %) lorsque le rapport $\frac{\text{adrénaline}}{\text{ac. ascorbique}} = 1$; il est plus faible de part et d'autre de cette proportion de l'inhibiteur au substrat.

(1) OBRECHT, *loc. cit.*

(2) YAMAMOTO, *Hoppe Seyler's*, 243, 266, 1936.

L'adrénaline subsiste inoxydée dans le milieu. Ce très intéressant travail démontre l'action inhibitrice réciproque de l'acide ascorbique et de l'adrénaline sur l'autoxydation de l'une ou de l'autre substance.

Si l'action inhibitrice de l'acide ascorbique pouvait sembler toute naturelle en raison de la valeur du potentiel d'oxydo-réduction de cette substance, l'action réciproque était moins prévisible.

On peut comme OBRECHT (1) rendre compte de ce phénomène par « l'inactivation » mutuelle des molécules, mais il semble que l'on puisse mettre en cause une action sur un catalyseur ion métallique, vraisemblablement le cuivre, qui serait commun aux deux substances et formerait un complexe devenu inactif à la suite de sa liaison avec les deux espèces de molécules (2).

Pour écarter tout mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique qui mettrait en œuvre un catalyseur métallique. OBRECHT invoque les expériences de GHOSH et le fait que l'addition de cyanure réalisant la soi-disant « complète absence de cuivre », n'arrête pas l'autoxydation de la vitamine.

On a dit plus haut ce qu'il fallait penser de ces expériences. On rappellera, en particulier, les expériences de SCHREUSS et SCHÜMMER (3) suivant lesquelles l'autoxydation « restante » de l'acide ascorbique, après immobilisation complète du cuivre serait le fait de traces de fer. Or, l'adrénaline fournit avec le fer de magnifiques complexes, semblables à ceux que fournit, dans les mêmes conditions de réaction, le pyrocatechol.

*Il est dès lors tout à fait légitime d'admettre que le fer est **inactif** par son entrée en liaison avec l'adrénaline et que de cette inactivation résulte l'inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique.*

En résumé, s'il paraît certain que l'acide ascorbique inhibe l'autoxydation de l'adrénaline pour des raisons qui tiennent aux valeurs des potentiels d'oxydoréduction des deux substances, il paraît probable que l'inhibition de l'autoxydation de

(1) OBRECHT, *loc. cit.*

(2) OBRECHT estime que l'oxydation de l'acide ascorbique n'est pas due à une action catalytique du cuivre, mais qu'il s'agit d'une propriété spécifique dépendant du pH.

(3) SCHREUSS et SCHÜMMER, *Biochem. Z.*, 304, 18, 1940.

l'acide ascorbique par l'adrénaline est due à l'inactivation par cette substance d'un ion métallique catalyseur (Fe).

Un certain nombre de somnifères et d'anesthésiques étudiés par OBRECHT, se comportent comme des inhibiteurs de l'oxydation à l'air des solutions tamponnées d'adrénaline : tels sont le véronal (acide diéthylbarbiturique) ; l'acide barbiturique ; la chlorétone $\left(\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{CCl}_3 \end{array} \right)$ qui possède des propriétés inhibitrices remarquables à la concentration de $\frac{5 \text{ M}}{10^6}$ et qui est utilisée pour la stabilisation des solutions d'adrénaline injectables.

Les substances sylfhydrylées, acide thioglycolique, acide thiolactique, chorhydrate de cystéine, l. cystéine, inhibent fortement l'autoxydation de l'adrénaline dans les expériences du même auteur.

OBRECHT fait remarquer que l'addition de SO_4Cu au système adrénaline-cystéine, en excès par rapport à la cystéine, fait disparaître l'action inhibitrice de la cystéine.

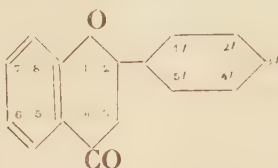
Il interprète ce fait, comme GHOSH (1) le fit dans ses propres expériences, où le cuivre supprimait de la même façon l'inhibition de l'oxydation de l'acide ascorbique par la cystéine, comme une inactivation de la cystéine par formation d'un complexe avec le cuivre. OBRECHT pense que l'entrée de la cystéine dans ce complexe supprime l'oscillation de la molécule organique entre les deux formes red et ox et, par là, supprime son pouvoir d'inhibiteur.

Il serait, croyons-nous, encore plus simple d'admettre que la cystéine exerce son action inhibitrice en se liant à des traces métalliques, constituant le catalyseur (Cu par exemple). L'addition ultérieure de cuivre en proportion équivalente à celle de la cystéine, ramène évidemment le système dans son état antérieur, où le métal exerce de nouveau son action catalytique. C'est à cette explication que nous nous rallions.

(1) GHOSH, *Biochem. Z.*, 289, 15, 1937.

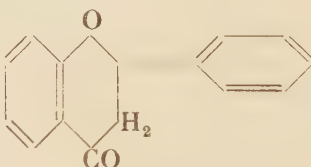
Inhibition de l'autoxydation de l'adrénaline par les dérivés de la flavone.

J'ai été amené à étudier les effets des dérivés de la flavone sur l'autoxydation de l'adrénaline à la suite d'une hypothèse de travail concernant le mécanisme d'action des extraits de plantes possédant la propriété vitaminique P. (1). La flavone ou phényl benzo γ pyrone répond à la formule



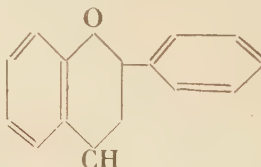
Les dérivés possédant, en 3, une fonction alcoolique OH sont désignés sous le nom de *flavonols*.

Les dérivés répondent à la formule



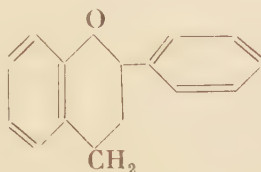
sont ceux de la flavanone.

Les corps naturels dérivant de la *flavone* ou du *flavonol* sont des substances polyhydroxylées ou méthoxylées. Ce sont des pigments végétaux de teinte généralement *jaune*, avec des nuances diverses. Les dérivés de la *flavanone* sont en général incolores, ou très peu colorés (l'hespérotol, l'ériodictyol sont incolores). Le squelette *flavonique* est très proche parent de celui des anthocyanes, pigments végétaux de teinte généralement violette avec des nuances également diverses. Le squelette anthocyanique est représenté par



(1) Cf. l'introduction de cette étude.

Il dérive facilement de la *flavone* par réduction au moyen du magnésium en solution acide. Une réduction plus poussée conduit aux catéchines dont le squelette est le suivant :



Les corps catéchiques sont incolores ; ils constituent une classe de tanins. On trouve d'ailleurs en général chez le même végétal les catéchines, les anthocyanes et les flavones correspondantes. On admet généralement que le métabolisme végétal réalise les transformations de ces corps les uns dans les autres, soit par oxydation, soit par réduction.

Les composés naturels ne sont généralement pas à l'état libre, mais sous forme de composés hétérosidiques ; la copule glucidique est constituée soit par du glucose, du rhamnosé ou encore par un bioside. Le groupement prosthétique étant un reste flavonique, anthocyanique ou catéchique.

J'ai recherché comment se comportent les solutions d'adrénaline, en milieux tamponnés, et exposées à l'autoxydation à l'air, en présence de dérivés polyhydroxylés naturels dérivés de la flavone.

Pour cette étude on a mis en œuvre deux méthodes de travail dont les résultats ont été analogues ; la technique micromanométrique dans laquelle l'oxygène absorbé par le corps qui s'autoxyde à l'air est directement mesuré et la technique colorimétrique qui consiste à mesurer l'intensité de la coloration rouge développée au cours de la formation de l'adrénochrome, dans les solutions d'adrénaline qui s'oxydent.

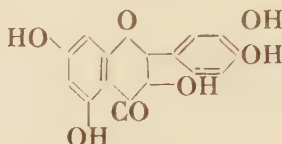
Dans tous les cas on a opéré sur des solutions tamponnées dont la concentration en ions H⁺ était suffisamment rapprochée de celle des liquides physiologiques, et toutefois compatibles avec une vitesse d'oxydation suffisante de l'adrénaline (solution de tyrode tamponnée au bicarbonate de sodium, solution de phosphates de pH 7,7 ou 8).

On a le plus souvent accéléré l'autoxydation par addition de minimes quantités de cuivre.

La concentration de l'adrénaline (d. l. adrénaline synthétique (1)) était, en général, égale à $3,6 \cdot 10^{-4}$ pour les études micromanométriques. Elle était, en général, égale à $1,3 \cdot 10^{-4}$ M pour les recherches colorimétriques.

Effet inhibiteur du quercétol.

Le quercétol est le 3, 5, 7, 3', 4' pantahydroxyflavone ou 5, 7, 3', 4' tétrahydroxyflavonol.



Le corps est mis en solution dans le tampon phosphaté de pH convenable, en s'aidant d'une quantité équivalente de soude. On vérifie que le pH de la solution reste celui de la solution tampon utilisée.

Etude micromanométrique. — Tampon phosphaté pH 8 — T. 31°2.

Les expériences sont réalisées suivant le schéma suivant : elles comportent trois séries de vases de WARBURG renfermant chacun 2,8 cc. de solution et 0,2 cc. de potasse dans l'ajutage central en vue de fixer le CO_2 éventuellement libéré.

Série	Tampon	Adrénaline	Quercétol	Cuivre	Eau
1	2,3 cc.	0,3 cc. = 0,183 mgr.	0	0,2 cc. = 80 γ	0
2	2 cc.	id	0,3 cc. = 0,2 mgr.	0,2 cc. = 80 γ	0
3	2 cc.	0	0,3 cc. = 0,2 mgr.	0,2 cc. = 80 γ	0,3 cc.

La solution mère d'adrénaline est préparée à partir de d. l. adrénaline dissoute dans une quantité équivalente d'acide chlorhydrique (solution M/3.10%).

Le graphique ci-après représente les deux courbes d'absorption de l'oxygène, par l'adrénaline seule et par le mélange

(1) Je remercie ici M. le Dr GUEUTIER, des établissements U. C. L. A. F. qui m'a très gracieusement procuré ce produit.

d'adrénaline et de quercétol. L'absorption d'oxygène par le quercétol est trop petite pour être mesurable. On notera que l'inhibition est sérieuse, la présence de quercétol à la concentration de 0,2 mgr. dans 2,8 cc., soit à la concentration moléculaire de $2,36.10^{-4}$ (réalisant la proportion de 1 molécule d'inhibiteur pour 1,5 molécule d'adrénaline) allonge à 56 minutes le temps nécessaire à l'absorption d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline : le temps correspondant à l'adrénaline seule est de 34 minutes.

A la 34^e minute, l'inhibition mesurée par le rapport des volumes d'oxygène absorbés est égale à 50 %.

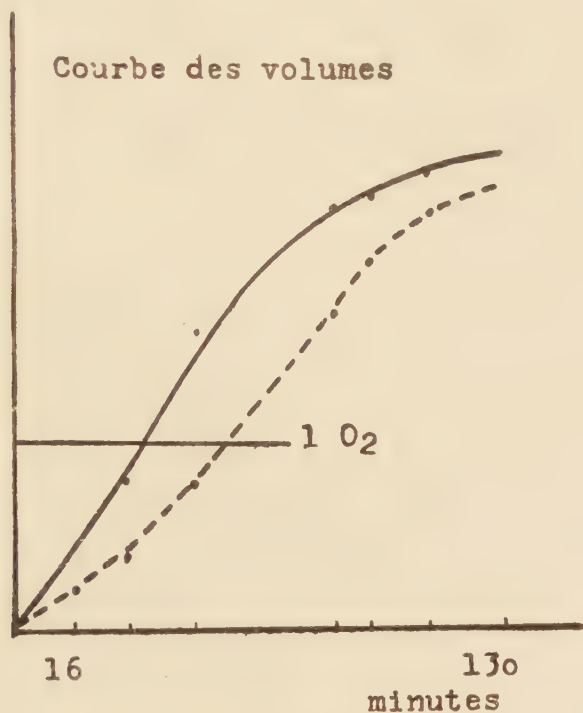


FIG. 17. — Autoxydation de l'adrénaline avec et sans quercétol. (Solution fraîche.)

Influence de la concentration en quercétol. — Dans une autre série d'expériences, on a doublé la quantité de quercétol. Les autres conditions restant les mêmes.

Sur le graphique ci-après, l'inhibition est plus importante que dans le cas précédent.

On notera cependant que l'absorption d'une molécule d'oxygène requiert un temps équivalent à celui de l'expérience précédente (58 m.).

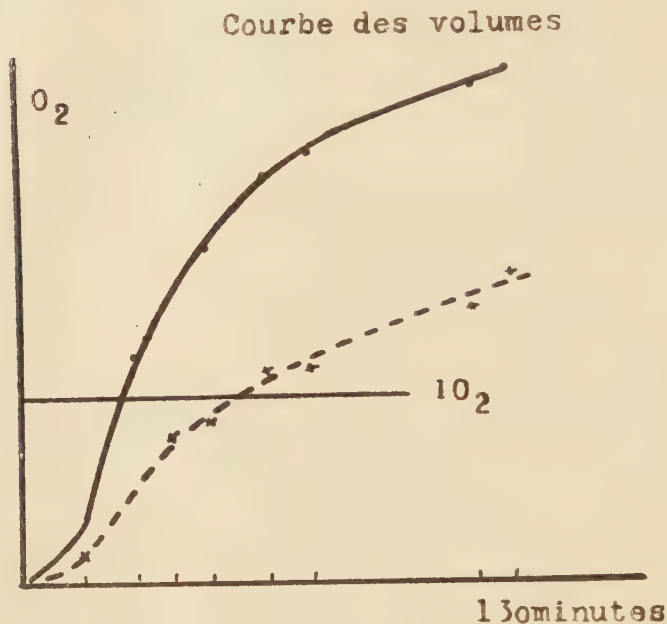


FIG. 18. — Inhibition par le quercétol.

L'effet inhibiteur de la dose double de quercétol (1 molécule pour 3/4 molécule d'adrénaline) est relativement plus important ici puisque le temps correspondant de l'adrénaline témoin n'est que de 26 minutes (au lieu de 34).

La valeur de l'inhibition au temps de 26 minutes, mesurée par le rapport de la différence des volumes d'oxygène absorbés au volume absorbé par l'adrénaline seule est sensiblement égale à 58 %.

Dans cette série d'essais la vitesse d'oxydation de l'adrénaline témoin est nettement supérieure à celle qu'elle présentait dans la série précédente. La raison doit en être trouvée dans le fait que la solution mère d'adrénaline à partir de laquelle sont préparés les milieux étudiés est une solution vieille de 24 heures, tandis qu'il s'agissait d'une solution neuve dans les essais précédents. L'influence de l'âge de cette solution fera plus loin l'objet d'un examen spécial.

Influence de la concentration en cuivre. — Dans une troisième série d'essais on a doublé la quantité de cuivre utilisé comme catalyseur : celle-ci est donc portée à 160 γ pour 2 cc. 8 ; les autres conditions sont identiques à celles de la première série : même quantité d'adrénaline, même quantité de quercétol. La solution mère d'adrénaline est préparée au moment de l'emploi.

Le graphique ci-dessous résume les résultats.

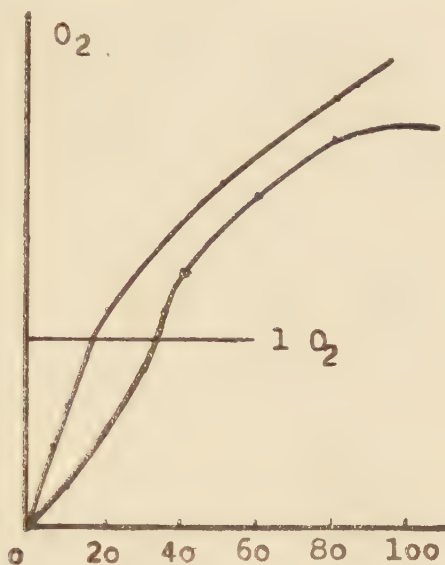


FIG. 19. — Inhibition par le quercétol.

L'oxydation de la solution témoin d'adrénaline est plus rapide que dans la première série, le cuivre exerce toujours une action catalytique positive (Concentration du cuivre : 9.10^{-4} soit plus de 3 atomes de cuivre par molécule de quercétol).

La courbe d'absorption de l'oxygène par l'adrénaline en présence du quercétol révèle tout d'abord une inhibition importante. L'adrénaline absorbant une molécule d'oxygène en 16 minutes, ce temps est en effet porté à 34 minutes pour la solution renfermant le quercétol.

L'inhibition correspondant au temps de 16 minutes, calculée de la même façon que plus haut, a pour valeur 63 %.

Il semble d'ailleurs que cette inhibition cesse lorsqu'une molécule d'oxygène a été mise en œuvre. Notons, en tout cas, qu'en présence de 3 atomes de cuivre par molécule de quercétol, l'oxydation de l'adrénaline est plus rapide que lorsque cette

proportion du cuivre au quercétol est de 1,5 à 1. Une molécule de quercétol est donc incapable d'annuler l'effet catalytique de 3 atomes de cuivre.

Dans une quatrième série d'essais on a doublé la proportion de quercétol tout en maintenant la proportion de cuivre existant dans l'expérience précédente. En outre, la solution mère d'adrénaline est vieille de 24 heures. Dans ces conditions l'adrénaline témoin s'oxyde avec une très grande vitesse et absorbe une molécule d'oxygène en trois minutes. En présence du quercétol, l'oxydation est d'abord extrêmement ralentie et, après une phase autocatalytique, il y a fixation d'une molécule d'oxygène en 57 minutes. Autrement dit, la vitesse d'autoxydation correspondant à la fixation d'une molécule d'oxygène est ici exactement la même que dans le premier et le second essais.

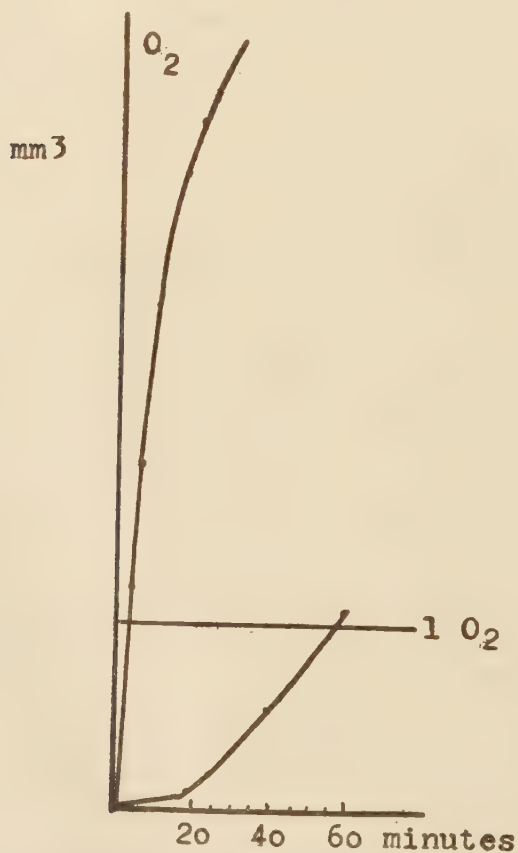


FIG. 20. — Inhibition par le quercétol (solution d'adrénaline vieillie).

Le supplément de quercétol que comprend la présente expérience par rapport à la première, soit $2,36.10^{-4}$ M suffit donc à annuler l'effet catalytique du supplément de cuivre ($4,5.10^{-4}$ atomes gr./litre), (1 molécule de quercétol pour 2 atomes de Cu).

Ce qu'il convient, pour l'instant, de noter, c'est que le quercétol inhibe partiellement l'autoxydation de l'adrénaline, que l'effet catalytique du cuivre est facilement annulé, mais que l'autoxydation « restante » étant la même dans trois séries d'essais (Cu : 80 γ et Quercétol 0,3 cc.), (Cu 80 γ et Quercétol 0,6 cc.), (Cu 160 γ et Quercétol 0,6 cc.), il semble clair que le quercétol est sans action sur une fraction d'autoxydation mesurée dans ces expériences par l'absorption d'une molécule d'oxygène en 57 minutes environ.

Etude colorimétrique.

Dans toutes les expériences où l'oxydation de l'adrénaline a été mesurée par colorimétrie du produit d'oxydation rouge (adrénochrome) on a procédé de la façon suivante :

L'adrénaline, dissoute dans une quantité équivalente d'acide minéral est répartie, à raison de 0, 5 ou 1 mgr., dans des tubes à essais en verre Pyrex de 20×200 m/m renfermant en outre 20 cc. de la solution tampon et des quantités variables de l'inhibiteur sous forme de son sel sodique dissous dans le même mélange tampon.

Exemple 1. — Chaque tube renferme 20 cc. de solution tampon aux phosphates (pH 8) et 0,5 mgr. d'adrénaline. Les tubes renferment, en outre, les quantités suivantes de quercétol : 0 ; 0,2 ; 0,4 et 1 mgr. Ils sont maintenus à la température de 18° et agités de temps en temps. Les liquides sont soumis à la mesure colorimétrique, au bout de 68 heures ; toutes les mesures sont faites en lumière verte. On constate que le liquide exempt de quercétol est le plus intensément coloré en rouge et que l'intensité de la coloration décroît avec l'élévation de la concentration de l'inhibiteur. Les chiffres indiquant des grandeurs à très peu près proportionnelles aux concentrations en adrénochrome, on remarque que l'oxydation est inhibée de 50 % pour une concentration en quercétol voisine de 0,23 mgr.

Sur le graphique ci-après les points ont été obtenus en déduisant des chiffres d'absorption lumineuse du mélange adrénaline-quercétol, les chiffres correspondants des solutions

ne renfermant que le quercétol. Une telle opération n'est que partiellement légitime étant donné que le quercétol lui-même, s'oxyde moins vite en présence d'adrénaline qu'en solution tamponnée et que l'absorption lumineuse correspondante est moins considérable. C'est ce qui explique l'existence d'une absorption négative pour la lecture correspondant à 1 mgr. de quercétol). La courbe ainsi construite donne cependant une idée des inhibitions réalisées par des doses croissantes de quercétol.

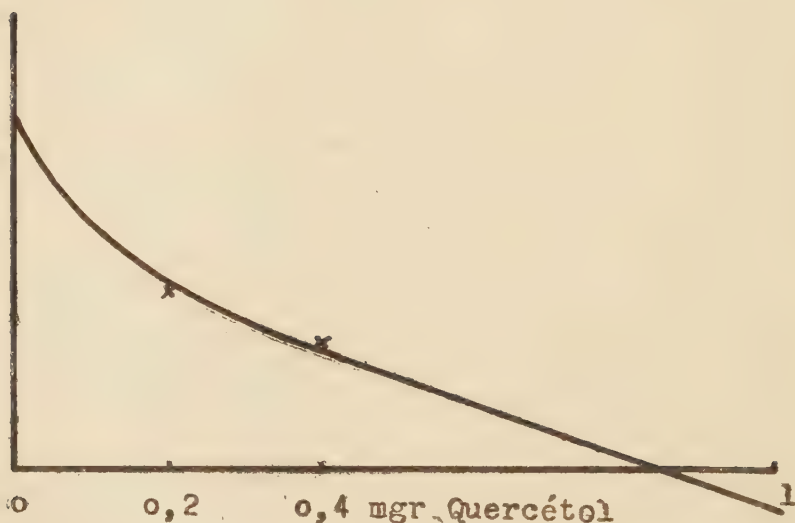


FIG. 21. — Inhibition par le quercétol. Courbe des densités optiques proportionnelles aux concentrations en adrénochrome.

Exemple 2. — Dans cet exemple, l'expérience a été réalisée dans des conditions analogues. La solution tampon était une solution de tyrode. Les courbes sont tracées comme précédemment en défalquant des chiffres lus les chiffres correspondant à la couleur propre du quercétol au même instant. La courbe 1 représente les résultats au bout de 225 min. à la température de 18° ; la courbe 2, ceux qui sont obtenus après que les tubes eussent été maintenus encore pendant 165 minutes à l'étuve à 34°.

On notera encore que l'inhibition atteint 50 % pour la concentration de quercétol représentée par 0,2 mgr.

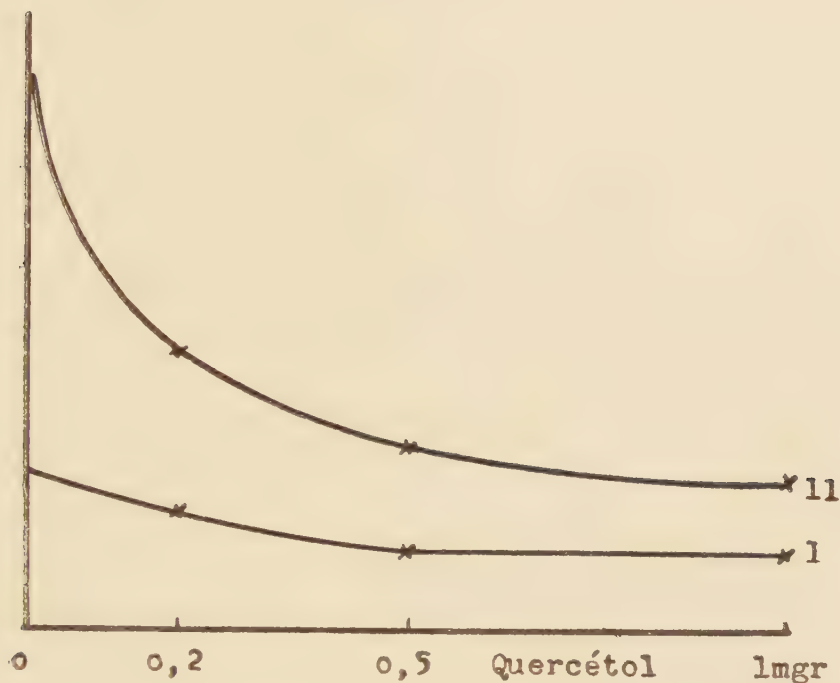


Fig. 22. — Inhibition de l'autoxydation de l'adrénaline par différentes concentrations de quercétol.

Exemple 3. — L'expérience est analogue à la précédente. Seules les conditions de température ont été modifiées. La courbe I représente les résultats au bout de 225 min. à 34° ; la courbe II après que les tubes eussent été maintenus encore 180 minutes à 18° C.

Dans tous les essais l'effet inhibiteur du quercétol est relativement beaucoup plus important aux plus basses concentrations. Il est non moins apparent, du moins dans les deux derniers exemples, que l'oxydation ne peut être complètement bloquée. L'oxydation « restante » en présence d'un milligramme de quercétol, atteint en effet environ 27 % dans l'exemple 2 et environ 34 % dans l'exemple 3. Ce résultat est d'ailleurs tout à fait conforme à ceux qui ont été donnés par l'étude cinétique de l'oxydation par la méthode micromanométrique.

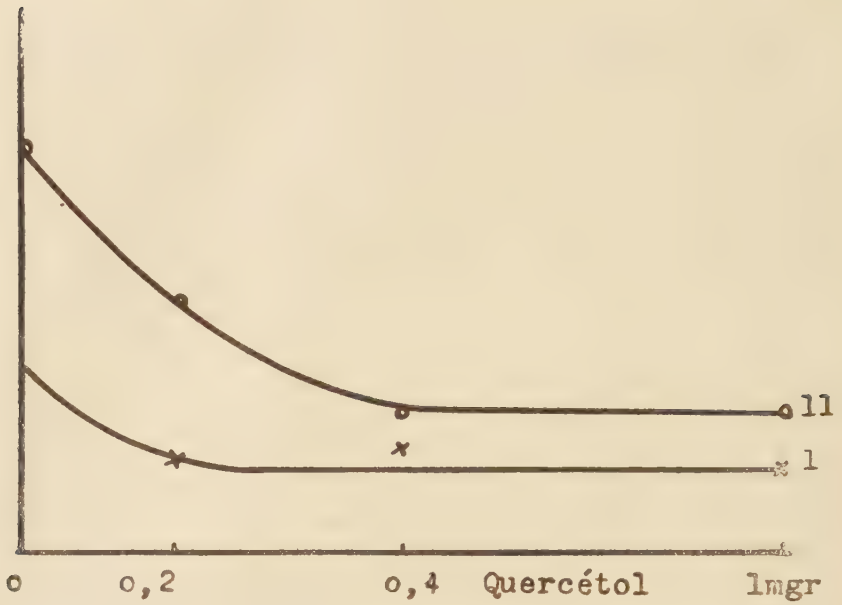


FIG. 23. — Inhibition par le quercétol.

Exemple 4. — Mêmes conditions expérimentales ; les quantités de quercétol mises en œuvre sont :

0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 mgr.

La courbe construite suivant les mêmes principes que plus haut au bout de 5 heures d'oxydation à 84° est la suivante :

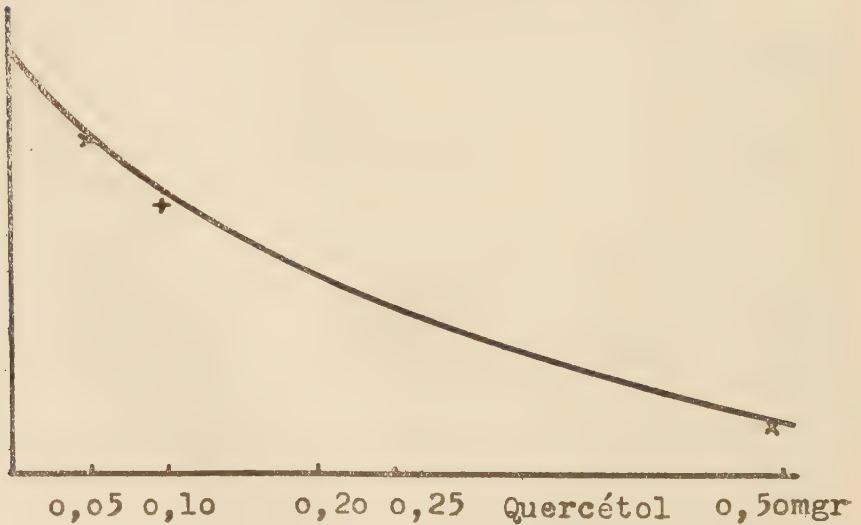


FIG. 24. — Inhibition par le quercétol.

Oxydation des solutions d'adrénaline neuves et vieilles.
Inhibition par le quercétol de l'autoxydation de ces solutions.

L'étude micromanométrique de l'oxydation de l'adrénaline en solutions tamponnées révèle que les solutions préparées à partir de solutions mères d'adrénaline âgées de 24 heures, s'oxydent avec une vitesse supérieure à celle des solutions préparées avec de l'adrénaline « fraîche ».

Les solutions mères sont obtenues en dissolvant 61 mgr. de d.l. adrénaline dans une quantité équivalente d'acide chlorhydrique ; on ajoute une trace d'acide chlorhydrique et amène à 100 cc. avec de l'eau distillée.

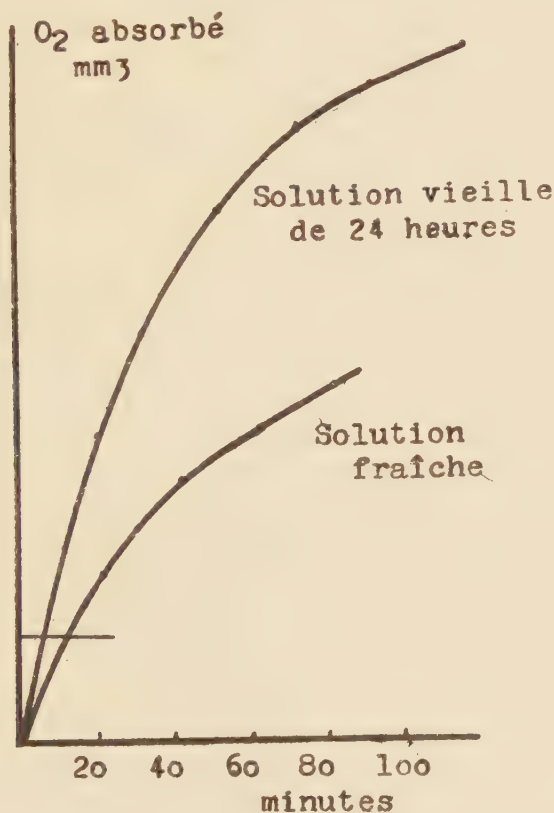


FIG. 25. — Courbes d'absorption de l'oxygène par des solutions préparées avec une solution mère d'adrénaline fraîche, et une solution mère vieillie.

La solution très légèrement acide se conserve, en apparence, très bien et, notamment, ne présente au bout de 24 heures, qu'une très légère coloration rose.

La solution vieille de 24 heures, mise en présence du tampon phosphaté dans l'appareil de WARBURG s'oxyde cependant plus rapidement que la solution neuve. Ce phénomène est surtout apparent lorsqu'on adjoint au liquide du vase manométrique 160 γ de cuivre. Les courbes d'absorption de l'oxygène sont figurées ci-dessus. Or, l'addition de quercétol à l'un et à l'autre de ces milieux réalise une inhibition qui amène les vitesses d'oxydation à la même valeur (Au moins les vitesses correspondant à la mise en œuvre d'une molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline. (Temps correspondant : 57 minutes contre 6 et 16 min.) L'activation réalisée par le vieillissement de la solution est donc complètement annulée par la présence du quercétol.

En résumé, ces expériences montrent :

1° que le quercétol peut faire disparaître entièrement l'effet catalytique du cuivre *ajouté* aux solutions d'adrénaline ;

2° qu'il est inactif sur une fraction de l'oxydation que nous avons appelée l'autoxydation restante ;

3° qu'il inhibe complètement un *autocatalyseur* développé dans les solutions d'adrénaline au cours de leur vieillissement.

Il n'est pas impossible que cet autocatalyseur soit l'adrénochrome, bien que sa concentration dût être extrêmement faible dans nos solutions vieilles de 24 heures, si l'on en juge par la très faible coloration rose présentée par celle-ci. Il reste donc vraisemblable que cet autocatalyseur soit un autre produit d'oxydation non coloré de l'adrénaline, peut-être un peroxyde, ou la forme peroxydique de la quinone (1).

J'ai en effet vérifié que l'oxydation de l'adrénaline par le peroxyde d'hydrogène, qui s'effectue très bien en présence de cuivre catalyseur, et qui ne se réalise pas en absence d'ion métallique lourd, peut être complètement inhibée par le quercétol.

(1) Voir chap. I.

Inhibition de l'autoxydation de l'adrénaline par d'autres dérivés de la flavone.

Les résultats de l'étude colorimétrique s'étant révélés analogues à ceux de la technique micromanométrique, les données qui suivent ont été obtenues par colorimétrie au moyen d'un appareil à cellules photoélectriques. Le même dispositif expérimental que pour l'étude du quercétol a été encore utilisé.

Rutoside.

Le rutoside est un hétéroside du quercétol. Il est à masses égales moins actif que son aglycone. Le graphique ci-dessous

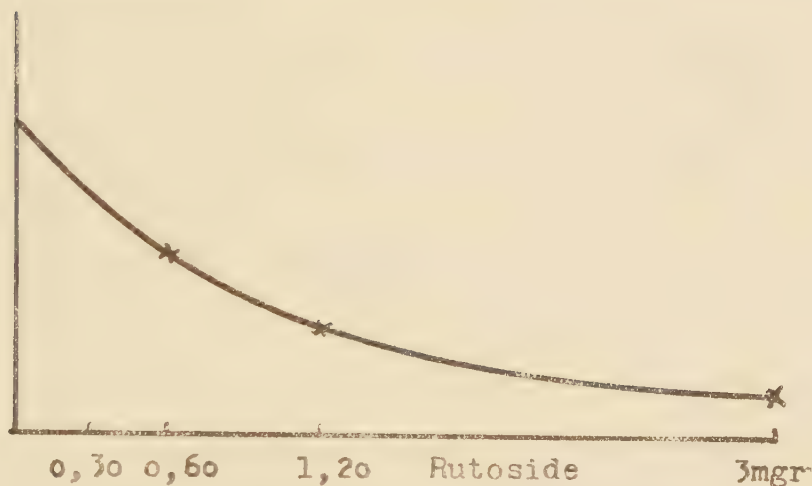


Fig. 26. — Inhibition par différentes doses de rutoside.

représente la courbe d'inhibition de l'autoxydation de l'adrénaline, dans le tampon phosphaté de pH 8, par des quantités croissantes de rutoside (Volume : 20 cc. Temps : 66 heures à 18°). La courbe a la même allure que celle qui représente l'inhibition par le quercétol. Une inhibition de 50 % s'observe à la concentration de 0,75 mgr., contre une concentration équivalente de 0,2 pour le quercétol.

Dans une autre expérience, réalisée suivant le même dispositif, on a étudié la cinétique colorimétrique de l'autoxydation de l'adrénaline, accélérée par le cuivre, en présence de rutoside (Volume 10 cc. ; adrénaline, 1 mgr. ; tampon phosphaté de pH 7,7 ; cuivre : 50 γ ; rutoside : 0 et 1,5 mgr.). Les courbes I et II ont été obtenues. Il y a ralentissement très net de l'oxydation par le rutoside.

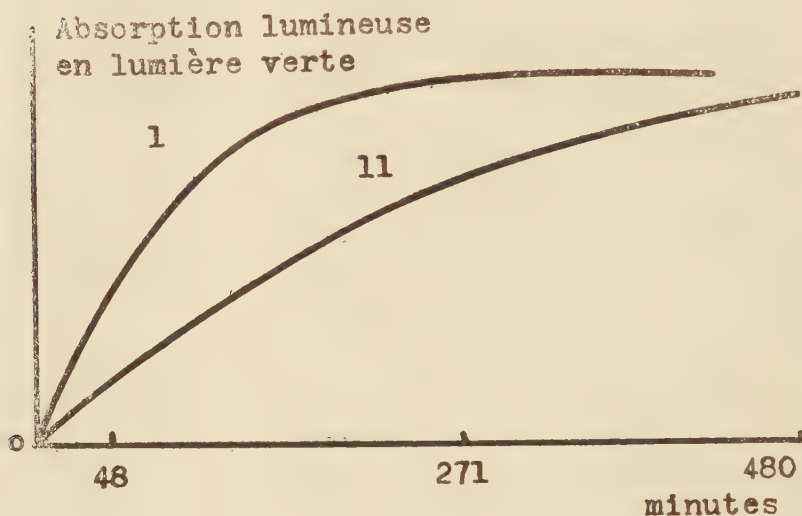


FIG. 27. — Absorption lumineuse (lumière verte) des solutions d'adrénaline, seule et additionnée de rutoside, en fonction du temps.

Naringoside.

Cet hétéroside possède comme groupement prosthétique un dérivé de la flavanone : la trihydroxy 7,5 4', flavanone. Il livre en outre à l'hydrolyse du glucose et du rhamnose. Ce corps se conduit également comme inhibiteur de l'autoxydation de l'adrénaline, mais à un degré beaucoup moindre que les dérivés flavonoliques. L'inhibition qu'il provoque étant assez faible, les mesures manquent de précision. Sur le graphique ci-après, on remarquera cependant que l'inhibition n'atteint 50 % que pour une concentration de 1,5 mgr. dans 20 cc. (tampon phosphaté pH 8 ; durée : 18 h. 30 à 18°).

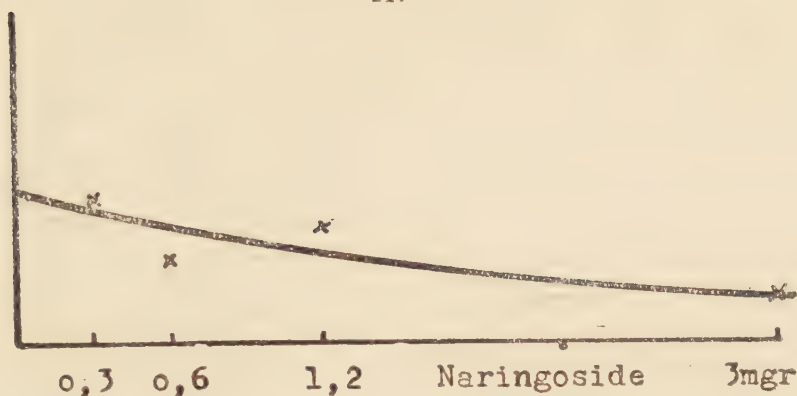


FIG. 28. — Inhibition (?) par le naringoside.

Rhamnétine.

Cette substance est un rhamnoside du monométhyl 7 quercétol. Ses effets inhibiteurs ont été déterminés par la méthode micromanométrique. Les conditions expérimentales sont analogues à celles des expériences effectuées avec le quercétol. (Tampon phosphaté, pH 7,7 ; 2 cc. ; adrénaline 0,5 mgr. ; rhamnétine : 0 et 0,5 mgr. ; cuivre catalyseur ; température : 32°5. A la 85^e minute l'inhibition est de 40 % ; 34 % à la 120^e ; 30 % à la 150^e minute).

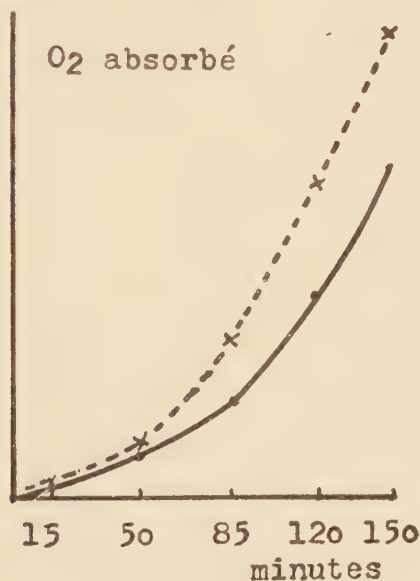


FIG. 29. — Inhibition par la rhamnétine.

* * *

Avec J. NEUMANN, j'ai montré (1) que les dérivés poly hydroxylés de la flavone, qui inhibent l'autoxydation de l'adrénaline, sont susceptibles de prolonger les effets de l'adrénaline sur l'intestin isolé du Cobaye (2). J'ai montré en outre que cette prolongation est due au maintien de l'adrénaline sous sa forme active (3). La technique des organes isolés devient donc une méthode pratique d'évaluation des effets inhibiteurs de l'oxydation de l'adrénaline. Par l'usage de cette méthode, j'ai établi et mesuré les effets inhibiteurs de deux nouvelles substances : le morinol : ou 5,7, 2', 4', tétrahydroxyflavonol et le lutéolol ou 5,7 3', 4', tétrahydroxyflavone.

Les chiffres suivants donneront une idée de l'ordre de grandeur des effets inhibiteurs de ces corps.

Un segment de gros intestin de cobaye immergé dans un bain de 140 cc. de liquide de tyrode bien aéré et maintenu à température constante, répond par un allongement et par la cessation de ses mouvements péristaltiques à l'introduction de minimes quantités d'adrénaline (10 γ). On a une bonne mesure de la durée de cet effet en mesurant le temps de demi-relâchement de l'organe. Or, ce temps est allongé par la présence, dans le liquide, d'une petite quantité de substance inhibitrice. Le facteur de multiplication du temps de demi-relâchement revêt les valeurs suivantes pour une concentration de l'inhibiteur égale à 1/350.000 (en poids) :

Quercétol	8,4
Rutoside	3
Lutéolol	4
Morinol	1,4
Adrénaline seule	1

Ces effets d'allongement sont obtenus dans des bains de Tyrode préparés avec de l'eau distillée deux fois dans un appareil en verre Pyrex et ne comportant par conséquent, que des traces minimes de métal catalyseur.

L'effet inhibiteur ne paraît donc pas pouvoir être attribué uniquement à la dissimulation du cuivre.

(1) LAVOLLAY et NEUMANN, *C. R. Ac. Sc.*, 1941, 212, 251.

(2) LAVOLLAY, *C. R. Soc. biol.*, 1941, 135, p. 193.

(3) LAVOLLAY, *C. R. Ac. sc.*, 214, 287-90, 1942.

L'addition au bain de minimes quantités de ce métal (80 γ) abrège sensiblement la réponse de l'organe à l'adrénaline. *Cet effet abrégé peut être annulé par l'apport de quantités proportionnelles d'un dissimulateur du cuivre, comme l'acide citrique ainsi que nous l'avons vu avec NEUMANN. Le même effet dissimulateur est obtenu en ajoutant au bain les inhibiteurs de nature flavonique.*

Discussion des résultats.

Le moment est venu d'interpréter le mécanisme de l'inhibition réalisée par les flavones et de le rattacher aux théories explicatives exposées ci-dessus.

Il est incontestable que ces substances annulent les effets catalytiques des traces de *cuivre*, métal qui se conduit comme un puissant catalyseur positif. Cette action est-elle banale et résulte-t-elle d'une inactivation du métal à la suite de son entrée en combinaison avec l'inhibiteur, réalisant une sorte de précipitation. Non, car aux concentrations étudiées il n'y a jamais formation de précipité. *De plus, si l'on remplace l'adrénaline par le pyrocatechol qui devient alors le substrat oxydable, dans un milieu tamponné aux phosphates et comportant du cuivre, on constate que les dérivés hydroxylés de la flavone se comportent comme des activateurs de l'oxydation de ce diphenol.*

Les essais ont été effectués par la technique colorimétrique. Les tubes contenaient 20 cc. de solution tampon, 2 mgr. de pyrocatechol, 70 γ de cuivre catalyseur et des quantités croissantes de l'inhibiteur. La courbe ci-après a été obtenue en portant en abscisses les quantités de quercétol et en ordonnées des grandeurs proportionnelles aux différences entre la densité optique du mélange de pyrocatechol-quercétol et celle de la solution correspondante de quercétol (pH 7,4 ; 27 heures à 18° C.).

Comme celui du quercétol, l'effet du rutoside sur l'autoxydation du pyrocatechol catalysée par le cuivre s'est révélé comme nettement positif et en rapport avec la concentration du rutoside (pH 7,7 de phosphates).

L'effet des dérivés de la flavone, inhibiteur dans le cas de l'adrénaline, positif dans celui du pyrotécachol, est nul dans le cas où le diphenol qui s'oxyde est l'hydroquinone. Vis-à-vis de l'autoxydation du *p.* diphenol catalysée par le cuivre, le rutoside et le quercétol sont indifférents : le cuivre continue d'exercer

son effet catalytique sans aucune modification de célérité. Il est donc établi que l'inhibition qui se vérifie dans le cas de l'adrénaline ne provient pas de l'« immobilisation » pure et simple du cuivre.

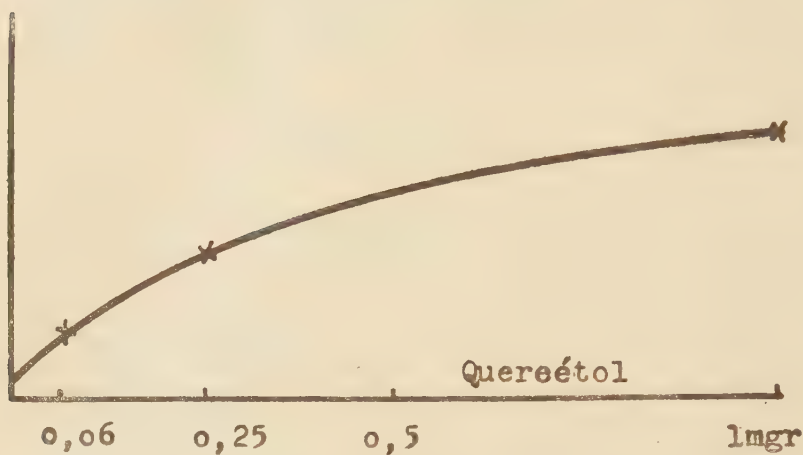


FIG. 30. — Catalyse de l'autoxydation du pyrocatéchol par le quercétol.

Il est non moins clair que la structure moléculaire de la substance qui s'autoxyde joue un rôle important dans la manière dont se comportent les dérivés de la flavone vis-à-vis de son oxydation catalysée par le cuivre.

On pourrait songer à une action directe de l'inhibiteur sur la molécule du substrat. Par exemple, on pourrait imaginer que la molécule de flavone entre en liaison avec l'adrénaline pour donner naissance à une combinaison du type phénoquinonique.

Cette explication ne serait valable que pour l'inhibition, elle serait en défaut dans le cas de l'hydroquinone et en contradiction avec l'effet positif observé sur l'exemple du pyrocatéchol.

Un second exemple de l'action directe de l'inhibiteur sur la molécule de substrat serait celui de l'inactivation possible des molécules activées de celui-ci par un mécanisme identique à celui de BAUR et de ses collaborateurs. (Inactivation par oscillation d'un système red-ox). On se heurte ici encore à la contradiction offerte par l'exemple du pyrocatéchol dont il faudrait admettre au contraire l'« activation » par les molécules des dérivés hydroxylés de la flavone.

La théorie de SZENT-GYÖRGYI semble au contraire trouver ici son application. L'adrénaline, comme le pyrocatechol, forme avec le cuivre un complexe dans lequel le métal « activé » joue le rôle de catalyseur d'oxydation en fixant O_2 et en assurant, à l'intérieur même du complexe, l'oxydo-réduction entre O_2 et la molécule de substrat. L'addition d'un dérivé de la flavone, provoque la formation d'un complexe mixte (adrénaline-flavone-cuivre), qui subit moins facilement l'oxydation et qui, dans le cas du pyrocatechol (substance dont le complexe cuprique est peu oxydable) fournit un complexe mixte (pyrocatechol-flavone-cuivre) plus facilement oxydable que le premier.

Dans le cas de l'hydroquinone, le métal a la même activité à l'intérieur du complexe mixte et dans le complexe simple hydroquinone-Cu.

La théorie de SZENT-GYÖRGYI n'explique pourtant qu'une partie des phénomènes observés, il ne semble pas qu'elle puisse fournir la clef de l'*inhibition* de l'oxydation rapide des solutions d'adrénaline « vieilles ».

Pourtant, si l'oxydabilité de ces solutions provient de l'accumulation d'un peroxyde il est légitime de supposer que ce peroxyde oxyde le substrat par l'intermédiaire du cuivre (action dite peroxydasique du cuivre). Dès lors, l'addition d'un inhibiteur susceptible de former un ion complexe avec le cuivre — comme les dérivés de la flavone — a pour effet, de soustraire des ions cuivre à la solution et par conséquent d'arrêter l'oxydation par le peroxyde. (Ainsi que je l'ai montré plus haut.)

Nous sommes arrivés à une explication cohérente de l'*inhibition* de l'oxydation de l'hormone. Le problème du « reste d'autoxydation » insensible aux dérivés de la flavone demeure posé. On peut supposer que cette autoxydation est l'œuvre d'un autre catalyseur, peut-être le fer.

RÉSUMÉ

L'autoxydation à l'air des solutions d'adrénaline a déjà fait l'objet de recherches multiples. J'ai été conduit à m'intéresser à ce problème à la suite d'une hypothèse de travail sur le mode d'action des extraits végétaux possédant la propriété vitaminique P. D'après cette hypothèse, les substances actives des extraits auraient une action inhibitrice de l'oxydation de l'adrénaline. Or, d'après SZENT-GYÖRGYI, à qui l'on doit la notion même de vitamine P, les substances actives de ces extraits seraient des dérivés de la flavone (phényl-benzo- γ pyrone).

Après avoir trouvé une première justification de l'hypothèse ci-dessus dans l'inhibition de l'oxydation des solutions d'adrénaline par les extraits d'écorces d'agrumes renfermant la fraction flavonique de ces écorces, j'ai voulu entreprendre l'étude particulière des effets d'un certain nombre de dérivés hydroxylés de la flavone sur cette oxydation.

L'action inhibitrice est toujours marquée, mais présente des intensités variables.

Il était intéressant de rechercher par quel mécanisme cette action inhibitrice s'exerce dans les solutions d'adrénaline. C'est pourquoi j'ai été conduit à examiner le phénomène d'autoxydation des diphénols et celui de l'adrénaline, qui en solution, commence à s'oxyder comme l'orthodiphénol en donnant naissance à l'orthoquinone.

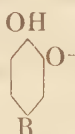
L'influence des sels alcalins utilisés comme tampons a d'abord retenu mon attention. J'ai trouvé, par la méthode micromannométrique que, pour des valeurs identiques de l'exposant d'hydrogène, l'oxydation de l'hydroquinone est sensiblement plus rapide dans la solution tamponnée au borate — ClH que dans la solution tamponnée aux phosphates. En comparant ces résultats avec ceux de la mesure des densités optiques des mêmes solutions dans différentes régions du spectre, j'ai vu que les produits de l'autoxydation sont différents.

Cherchant comment varie la vitesse initiale d'autoxydation du pyrocatechol avec l'exposant d'hydrogène, j'ai trouvé que le logarithme de la vitesse initiale croît linéairement avec l'exposant d'hydrogène. Ce résultat conduit à admettre que c'est l'ion

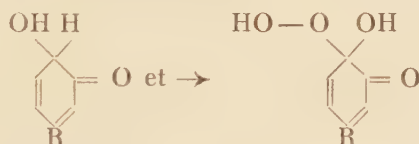
monovalent  qui est en jeu dans l'autoxydation du pyrocatechol en solution aqueuse tamponnée aux phosphates. Ce résultat est en contradiction avec ceux de BLIX.

Le même résultat a été obtenu dans les solutions tamponnées au borate — ClH.

Comme dérivé du pyrocatechol il est vraisemblable que l'adrénaline elle-même s'oxyde avec une vitesse proportionnelle à la

concentration de l'ion monovalent . Comme celles de l'hy-

droquinone et du pyrocatechol, l'oxydation de l'adrénaline débute par une réaction d'addition d'une molécule d'oxygène. Il en résulte que la susceptibilité de la molécule d'adrénaline dépend directement de la concentration en ions OH de la solution. La molécule active présente la structure quinolique



Le mécanisme ainsi proposé serait exclusivement celui des solutions exemptes de catalyseurs. Dans ces conditions, il peut également se former une forme peroxydique de la quinone (Analogie avec le pyrocatechol).

L'étude de la catalyse positive de l'autoxydation de l'adrénaline fait l'objet du second chapitre de ce travail. On y examine les différents types de catalyseurs organiques connus et l'on discute le mécanisme de leur action.

Dans le cas de la catalyse par l'acide succinique, j'ai montré que le mécanisme invoqué par MARQUARDT, la déshydrogénation de l'adrénaline par l'acide fumarique résultant de l'oxydation de l'acide succinique, ne correspond pas à la réalité en présence d'oxygène, puisque l'acide fumarique ne catalyse pas l'autoxydation de l'adrénaline.

J'ai trouvé que l'hydroquinone exerce une action positive sur l'autoxydation de l'adrénaline.

De même, le pyrocatéchol exerce une catalyse positive d'autant plus remarquable que le potentiel normal d'oxydoréduction du pyrocatéchol est moins positif que celui de l'adrénaline.

Il est possible d'attribuer cette action à la différence de stabilité entre les quinones des deux substances.

L'étude micromanométrique du phénomène m'a permis d'établir que l'orthoquinone du pyrocatéchol se conduit comme catalyseur de l'oxydation de l'adrénaline ; l'allure de l'absorption d'oxygène par le mélange est celle du pyrocatéchol tant qu'il reste de cette substance à oxyder en quinone ; plus tard, cette allure est celle de l'oxydoréduction entre l'orthoquinone et l'adrénaline.

Les résultats obtenus lorsque des traces de cuivre sont ajoutées à ce système, montrent que l'adrénaline entre en concurrence avec le pyrocatéchol pour lier le cuivre ; l'adrénaline restreint ainsi l'oxydation du pyrocatéchol et lorsque celui-ci est transformé en quinone, l'oxydoréduction — catalysée par le cuivre — intervient entre ce corps et l'adrénaline.

J'ai trouvé en outre que le résorcinol catalyse l'autoxydation de l'adrénaline et que le pyrocatéchol inhibe celle de l'hydroquinone.

On propose ensuite une théorie de l'autocatalyse de l'oxydation des solutions d'adrénaline, mettant en jeu l'adrénochrome.

Les ions métalliques peuvent exercer une forte action catalytique ; celle du cuivre est particulièrement nette. On discute le mécanisme de cette action et l'on se rallie à la belle théorie élaborée par SZENT-GYÖRGYI. Cette théorie est illustrée par une étude micromanométrique de l'oxydation du pyrocatéchol avec et sans cuivre, en solutions tamponnées.

L'inhibition de l'autoxydation fait l'objet du dernier chapitre.

On examine d'abord les théories qui ont été proposées pour rendre compte de ce phénomène ; on discute leurs domaines de validité (théorie des peroxydes de MOUREU et DUFRAISSE, de DUPONT ; théorie de l'inhibition par « circuit latéral » mettant en jeu un système red-ox (E. BAUR) ; théorie de l'immobilisation des catalyseurs positifs (TITOFF) ; théorie de l'inhibition par formation de complexes inactifs mixtes (SZENT-GYÖRGYI).

Les phénomènes essentiels qui ont motivé ce travail concernent l'inhibition de l'autoxydation des solutions d'adrénaline par les

dérivés de la flavone. Un certain nombre de résultats expérimentaux ont été obtenus, soit par la mesure directe de l'oxygène absorbé, à l'aide de la technique micromanométrique de BARCROFT-WARBURG, soit par la technique colorimétrique.

L'importante inhibition réalisée par des corps comme le quercétol et le rutoside, est cependant limitée. On constate toujours une autoxydation restante.

La fraction de l'autoxydation qui est bloquable par les flavones apparaît comme composée de deux parts; celle qui résulte de la préexistence dans la solution d'un autoxydateur et celle qui est l'œuvre des traces de cuivre.

L'inhibition de la catalyse par le cuivre ne peut s'expliquer par une simple immobilisation du métal (TITOFF) car si l'on remplace l'adrénaline par le pyrocatechol, on constate au contraire que les dérivés de la flavone activent l'oxydation de ce diphénol catalysée par le cuivre.

La théorie de l'« inactivation » de BAUR est également en défaut.

L'inhibition s'explique par contre très bien en admettant, conformément à la théorie de SZENT-GYÖRGYI sur l'oxydation déshydrogénante, que l'adrénaline et la flavone donnent avec le cuivre un complexe mixte, à l'intérieur duquel le métal est inactif.

La liaison du cuivre sous forme de ce complexe permet également d'expliquer le *bloquage de l'autoxydateur* (peroxyde, ou forme peroxydique de l'orthoquinone), autoxydateur qui ne peut oxyder le substrat que par l'intermédiaire des ions Cu. J'ai d'ailleurs montré l'importance de cet ion pour l'oxydation de l'adrénaline par l'eau oxygénée et par la quinone du pyrocatechol.

Quant à la fraction de l'autoxydation qui est insensible aux dérivés de la flavone, il est vraisemblable qu'elle est due à la présence de traces de fer; la preuve de l'autoxydabilité de la molécule d'adrénaline en absence de tout catalyseur minéral n'a en effet, jusqu'à présent pas été faite.

DEUXIÈME THÈSE

Etat actuel du problème de la structure
de la vitamine P et de son rôle fonctionnel.

Vu et approuvé :

Paris, le 11 décembre 1942.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL MONTEL.

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

GILBERT GIDEL.



